

Sabine Hauck

Identifizierung und Charakterisierung
vesikulärer Strukturen im caninen Ejakulat
sowie Untersuchungen zu deren
funktioneller Bedeutung



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und
Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Assoc. Prof. Dr. S. Goericke-Pesch
Prof. Dr. A. Wehrend

Identifizierung und Charakterisierung vesikulärer Strukturen im caninen Ejakulat sowie Untersuchungen zu deren funktioneller Bedeutung

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Sabine Hauck

Tierärztin aus Speyer

Gießen 2015

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. A. Wehrend

Assoc. Prof. Dr. S. Goericke-Pesch

Prof. Dr. M. Bergmann

Tag der Disputation: 07.09.2015

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte, fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus- Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Sabine Hauck

Diese Forschungsarbeit wurde von der Akademie für Tiergesundheit und der Gesellschaft zur Förderung kynologischer Forschung finanziell gefördert.

Meinen Eltern

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits

auf der „47. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung 2014“, gleichzeitig „39. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung Gießen“ vom 27- 28. Februar 2014 in Gießen:

Hauck, S., Wehrend, A., Bergmann, M., Lochnit, G., Goericke-Pesch, S. (2014):
Identification and characterization of vesicular structures in the canine ejaculate and their effect on sperm motility.

In: Reprod. Dom. Anim. 49, Suppl. 1, 49 [Abstract]

und

auf dem “17th EVSSAR Congress: Reproduction and Pediatrics in Dogs, Cats and Exotics” am 26. September 2014 in Wroclaw, Polen

Hauck, S., Wehrend, A., Bergmann, M., Lochnit, G., Goericke-Pesch, S. (2014):
Identification and characterization of vesicular structures in the canine ejaculate and their effect on sperm motility.

In: Proceedings of the 17th EVSSAR Congress: Reproduction and Pediatrics in Dogs, Cats and Exotics, 2014, 147

und

im Journal: Micron : The international research and review journal for microscopy

Goericke-Pesch, S.; Hauck, S.; Bergmann, M.; Wehrend, A. (2015):
Morphological characterisation of vesicular structures in the canine ejaculate.

In: Micron 77, S. 66-73

und

im Journal: Theriogenology: International journal of animal reproduction

Goericke-Pesch, S.; Hauck, S.; Failing, K.; Wehrend, A. (2015):
Effect of seminal plasma vesicular structures in canine frozen-thawed semen.

In: Theriogenology [Article in press]

publiziert.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung	16
2	Literatur	18
2.1	Terminologie vesikulärer Strukturen im luminalen Kompartiment des männlichen Geschlechtstrakts	18
2.2	Gewinnung von vesikulären Strukturen	19
2.3	Vesikel in der Sekretionsflüssigkeit des Genitaltrakts des Mannes	20
2.3.1	Ursprung der Vesikel	20
2.3.2	Vesikel aus dem Seminalplasma.....	21
2.3.3	Vesikel aus dem Nebenhodenepithel (Epididymosomen)	37
2.3.4	Vesikel aus prostaticen Tumorzellen und deren Bedeutung für die Tumordiagnostik	38
2.4	Vesikel in der Sekretionsflüssigkeit des Genitaltrakts der Rammeler (Kaninchen)	40
2.4.1	Ursprung und Morphologie der Vesikel	40
2.4.2	Biochemie der Vesikel	41
2.4.3	Interaktion der Vesikel mit Spermien.....	42
2.5	Vesikel in der Sekretionsflüssigkeit des Genitaltrakts des Ebers	44
2.5.1	Ursprung der Vesikel	44
2.5.2	Morphologie der Vesikel	44
2.5.3	Biochemie der Vesikel	45
2.5.4	Interaktion der Vesikel mit Spermien.....	45
2.6	Vesikel in der Sekretionsflüssigkeit des Genitaltrakts des Bullen	46
2.6.1	Ursprung der Vesikel.....	46
2.6.2	Vesikulosomen	47
2.6.3	Epididymosomen	48
2.7	Vesikel in der Sekretionsflüssigkeit des Genitaltrakts des Schafbocks	51
2.7.1	Morphologie und Ursprung der Vesikel	51
2.7.2	Biochemie der Vesikel	52
2.7.3	Interaktion der Vesikel mit Spermien.....	52
2.8	Vesikel in der Sekretionsflüssigkeit des Genitaltrakts des Hengstes	53
2.8.1	Morphologie der Vesikel	53
2.8.2	Biochemie der Vesikel	53
2.8.3	Interaktion der Vesikel mit den Spermien	54
2.9	Vesikel in der Sekretionsflüssigkeit des Genitaltrakts des Rüden.....	55
2.9.1	Ursprung der Vesikel	55

Inhaltsverzeichnis

2.9.2	Morphologie der Vesikel	56
2.9.3	Biochemie der Vesikel	56
3	Material und Methoden	57
3.1	Probanden	57
3.2	Spermagewinnung.....	57
3.3	Spermatologische Untersuchung	58
3.3.1	Progressive Spermienmotilität	59
3.3.2	Dichte	59
3.3.3	Lebend-Tot-Verhältnis (Eosin-gefärbter Spermienausstrich).....	60
3.3.4	Pathomorphologie (Eosin-gefärbter Spermienausstrich)	60
3.4	Aufreinigung der Vesikel	60
3.4.1	Ermittlung des Zentrifugationsprotokolls (Vorversuch).....	61
3.4.2	Aufreinigungsprotokoll.....	62
3.4.3	Proteinbestimmung mittels BCA-Kit.....	65
3.5	Elektronenmikroskopie	67
3.5.1	Gewinnung der Vesikelpuben (Vorversuch)	67
3.5.2	Aufbereitung der Proben für die Elektronenmikroskopie.....	68
3.5.3	Deskriptive und statistische Auswertung.....	69
3.6	Proteinanalyse.....	70
3.6.1	SDS-PAGE.....	70
3.6.2	MALDI-TOF-MS.....	73
3.7	Lipidanalyse	74
3.7.1	Ansetzen der Lipidstandardlösungen	74
3.7.2	Lipid-Extraktion nach Folch (modifiziert)	75
3.7.3	Dünnschichtchromatographie.....	76
3.8	Untersuchung der vesikulären Wirkung auf Tiefgefriersperma.....	84
3.8.1	Studiendesign und Zielsetzung	84
3.8.2	Dichtegradientenzentrifugation	85
3.8.3	Kryokonservierung des Spermas	88
3.8.4	Spermatologische Untersuchung	89
3.8.5	Statistische Auswertung	92
4	Ergebnisse.....	94
4.1	Ergebnisse der Lichtmikroskopie.....	94
4.2	Ergebnisse der Transelektronenmikroskopie.....	98
4.2.1	Deskriptive Beobachtung	98

Inhaltsverzeichnis

4.2.2	Messung der Vesikeldurchmesser.....	103
4.2.3	Häufigkeitsverteilung der unterschiedlichen Vesikeltypen.....	105
4.3	Ergebnisse der Lipidanalyse	108
4.4	Ergebnisse der Proteinanalyse	111
4.4.1	SDS-PAGE.....	111
4.4.2	MALDI-TOF-Analyse.....	114
4.5	Ergebnisse des Tiefgefrierversuches	115
4.5.1	Tiefgefrierversuch Teil 1	115
4.5.2	Tiefgefrierversuch Teil 2	133
5	Diskussion	145
5.1	Diskussion der Fragestellung	145
5.2	Diskussion der Methodik.....	147
5.2.1	Diskussion der Probandenauswahl	147
5.2.2	Methodik der Vesikelaufreinigung.....	148
5.2.3	Methodik der Spermagewinnung.....	151
5.2.4	Methodik der spermatologischen Untersuchung	151
5.2.5	Methodik der Elektronenmikroskopie	153
5.2.6	Methodik der Proteinanalyse	154
5.2.7	Methodik der Lipidanalyse	154
5.2.8	Methodik des Tiefgefrierversuches.....	156
5.3	Diskussion der Ergebnisse	163
5.3.1	Elektronenmikroskopie	163
5.3.2	Proteinanalyse	166
5.3.3	Lipidanalyse	170
5.3.4	Tiefgefrierversuch.....	177
5.4	Schlussbetrachtung und Fazit für die Praxis.....	184
5.5	Offene Fragestellungen	186
6	Zusammenfassung.....	187
7	Summary.....	190
8	Literaturverzeichnis	193
9	Anhang.....	219
10	Danksagung	247

Abkürzungsverzeichnis

A. bidest.	Aqua bidestillata, lateinisch für bidestilliertes Wasser
A.dest.	Aqua destillata, lateinisch für destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
ABCG2	ATP-binding cassette sub-family G member 2 protein
Adj. Vol.	Adjusted Volume, englisch für angepasstes Volumen (Volumen abzüglich Hintergrundvolumen)
ADP	Adenosindiphosphat
ALH	Amplitude of lateral head displacement, englisch für durchschnittliche seitliche Kopfauslenkung der Samenzellen [μm]
AMP	Adenosinmonophosphat
AOC	Average orientation change (of the head), englisch für durchschnittlicher Richtungswechsel des Spermienkopfes [Grad]
ApnA	Diadenosinpolyphosphate
APS	Ammoniumperoxodisulfat, $\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$
ASA	Antispermien-Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninic acid, englisch für Bicinchonininsäure
BCF	Beat cross frequency, englisch für Anzahl der seitlichen oszillatorischen Bewegungen des Spermienkopfes um die mittlere Bahn [Hz]
bp	base pair(s), englisch für Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca^{2+}	Zweifach positiv geladene Calciumionen
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CASA	Computer-assisted sperm analysis, englisch für Computergestützte Spermienanalyse
CCBS	Cumulative CAMAG Bibliography Service
CD	Cluster of differentiation, englisch für "Unterscheidungsgruppen"
Ch	Cholesterol
cm^3	Kubikzentimeter

Abkürzungsverzeichnis

CRISP1	Cysteine-rich secretory protein 1
Cu^+	Einfach positiv geladene Kupferionen
Cu^{2+}	Zweifach positiv geladene Kupferionen
CuSO_4	Chemische Summenformel für Kupfersulfat
d.h.	das heißt
DAP	Distance average path, englisch für zurückgelegte Durchschnittsstrecke [μm]
DC	Dünnschichtchromatographie
DCL	distance curved line, englisch für zurückgelegte Kurvenstrecke [μm]
DNA	Deoxyribonucleic acid, englisch für Desoxyribonukleinsäure
DRM	Detergent-resistant membranes
DSL	distance straight line, englisch für zurückgelegte geradlinige Strecke [μm]
DU145	Zelllinie humaner Prostatatumorzellen
E. Coli	Escherichia coli
Ecto-ADA	Adenosin-ecto-Deaminase
ELSPBP1	Epididymal sperm binding protein 1
EM	Elektronenmikroskop
Equex	Equex STM Paste
Et al.	et alii, lateinisch für und andere
g	Beschleunigung: g-Kraft/ g-Beschleunigung
g	Gewicht: Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
Ges.LP	Gesamtlipidphosphorgehalt
GliPr1L1	Glioma pathogenesis-related 1-like protein 1
GLIPR2	Glioma pathogenesis-related protein 2
h	Hour(s), englisch für Stunde(n)
hCAP-18	Human cationic antimicrobial protein 18
HCl	Chemische Summenformel für Salzsäure
HE1	Epididymal secretory glycoprotein 1
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HOS	Hypoosmotischer Schwelltest
HPLC	High performance liquid chromatography
HPTLC	High-performance thin-layer chromatography, englisch für

Abkürzungsverzeichnis

	Hochleistungsdünnschichtchromatographie
KCl	Chemische Summenformel für Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Chemische Summenformel für Kaliumdihydrogenphosphat
LBP	Lipopolysaccharide binding protein
LIN	Linearity (VSL/VCL), englisch für Linearität [%]
LM	Lichtmikroskop
LNCaP	Zelllinie humaner Prostatatumorzellen
M	Mol pro Liter
MAC	Membrane attack complex
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight Mass spectrometry, englisch für Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation – Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator
Max.	Maximum
µg	Mikrogramm
Mg ²⁺	Zweifach positiv geladene Magnesiumionen
microRNA	micro Ribonucleic acid, englisch für kurze, nicht-codierende Ribonukleinsäure
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
Min.	Minimum
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mm ²	Quadratmillimeter
Mn ²⁺	Zweifach positiv geladene Manganionen
mRNA	Messenger Ribonucleic acid, englisch für Boten - Ribonukleinsäure
n	Anzahl
Na ₂ HPO ₄	Chemische Summenformel für Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Chemische Summenformel für Natriumchlorid
NAD	Nicotinamid–Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaN ₃	Chemische Summenformel für Natriumazid
NK	Natürliche Killerzellen

Abkürzungsverzeichnis

nm	Nanometer
NO	Chemische Summenformel für Stickstoffmonoxid
Nox	NAPDH-Oxidase
NPC2	Niemann Pick C2 protein
Nr.	Nummer
p	p-value von probability, englisch für Wahrscheinlichkeit; p-Wert (Signifikanzwert)
PBS	Phosphate buffered saline, englisch für phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PC3	Zelllinie humaner Prostatatumorzellen
PE	Phosphatidylethanolamin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
Ph/Ch	Phospholipid–Cholesterol-Verhältnis
PI	Phosphatidylinositol
PIP	Prolactin–inducible protein
PKA/ PKC	Proteinkinase A bzw. C
Pr.	Protein
Prp ^c	Zelluläres Prionprotein
PS	Phosphatidylserin
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
Rab	Ras-related in brain
RAGE	Receptor for advanced glycation end–products
RD	Reflection density, englisch für Reflektionsdichte
R _f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleic acid, englisch für Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species, englisch für reaktive oxidative Substanzen bzw. reaktive Sauerstoffspezies
SD	Standard deviation, englisch für Standardabweichung
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, englisch für Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SF	Streufaktor
SM	Sphingomyelin

Abkürzungsverzeichnis

SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
STR	Straightness (VSL/VAP), englisch für Geradlinigkeit [%]
T	Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten
Tab.	Tabelle
TEM	Transelektronenmikroskop
TEMED	Tetramethylethylendiamin, $C_6H_{16}N_2$
TLC	Thin-layer-Chromatography, englisch für Dünnschichtchromatographie
TLR	Toll-like-Rezeptor
TRH	Thyreotropin Releasing Hormon
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, $C_4H_{11}NO_3$
UV	Ultraviolett
v/v	Volume/volume
VAP	Velocity average path(way), englisch für mittlere Geschwindigkeit (Geschwindigkeit über die gemittelte Bahn) [$\mu\text{m}/\text{sec}$]
VCL	Velocity curved line (velocity curvilinear), englisch für kurvilineare Geschwindigkeit (Geschwindigkeit über die tatsächlich zurückgelegte Bahn) [$\mu\text{m}/\text{sec}$]
VIP	Vasoaktives intestinales Polypeptid
VK	Varianzkoeffizient
vs.	versus
VSL	Velocity straight line, englisch für lineare Geschwindigkeit (Geschwindigkeit über eine gerade Linie vom Anfang zum Ende) [$\mu\text{m}/\text{sec}$]
WOB	Wobble (VAP/VCL), englisch für Schwankung (der kurvilinearen Strecke um die mittlere Strecke) [%]
\bar{x}	Aritmetisches Mittelwert
\bar{x}_{mod}	modifizierter Mittelwert nach Rücktransformation
\bar{x}_{geom}	geometrischer Mittelwert
z.B.	zum Beispiel
Zn^{2+}	Zweifach positiv geladene Zinkionen

1 Einleitung und Fragestellung

Neben Spermien enthält das Ejakulat im Seminalplasma lichtmikroskopisch nachweisbare, vesikuläre Strukturen, denen bei vielen Spezies eine fertilitätsfördernde Wirkung zugeschrieben wird. Während morphologische und funktionale Charakteristika dieser seminalen Partikel beim Menschen sowie bei verschiedenen anderen Spezies bereits ausführlich untersucht wurden, ist über derartige Strukturen im caninen Ejakulat nur sehr wenig bekannt.

Ergebnisse aus Forschungsarbeiten anderer Spezies, die Einflüsse auf Spermienmotilität, Kapazitation und Akrosomreaktion sowie antioxidative, immunmodulierende und antimikrobielle Eigenschaften der Vesikel belegen, lassen auch beim Rüden eine wichtige, einflussreiche Rolle solcher vesikulären Partikel im Rahmen des Fortpflanzungsprozesses vermuten.

Die steigende Bedeutung der künstlichen Besamung mittels Tiefgefriersperma im Bereich der Hundezucht sowie die enorme Relevanz einer möglichst hohen, progressiven Spermienmotilität hinsichtlich des Besamungserfolges motivieren in diesem Zusammenhang zur näheren Erforschung dieser Vesikel, die eventuell - als körpereigene, natürliche Strukturen - auch in der Praxis ein neues Medium zur Optimierung der Fertilität darstellen könnten.

Das Ziel dieser Arbeit war daher, neue grundlegende Erkenntnisse über die vesikulären Strukturen im caninen Ejakulat, die bereits bei Routineuntersuchungen von Rüdensperma lichtmikroskopisch aufgefallen waren, zu erlangen. Nach der Etablierung eines geeigneten Aufreinigungsprotokolles für die Isolierung dieser Strukturen aus dem Ejakulat lagen die Schwerpunkte des Forschungsprojektes in der detaillierten Betrachtung der ultrastrukturellen Morphologie mittels Transelektronenmikroskopie sowie einer eingehenden Untersuchung der biochemischen Zusammensetzung der Partikel. Diese erfolgte mittels SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, englisch für Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese), MALDI-TOF-MS-Analyse (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass spectrometry, englisch für Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator) unterschiedlicher, ausgewählter Proteinbanden und einer Lipidanalyse. Letztere wurde mittels HPTLC (High-performance thin-layer chromatography, englisch für Hochleistungsdünnschicht-chromatographie) nach Folch-Extraktion, nachfolgender

Iodfärbung und Densitometrie mit Hauptaugenmerk auf den Substanzen Cholesterol, Sphingomyelin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin durchgeführt.

Um eine mögliche, praktische Bedeutung der Vesikel für deren Einsatz in der künstlichen Besamung und somit in der Hundezucht zu erforschen, wurde darüber hinaus die Wirkung der vesikulären Partikel auf unterschiedliche Eigenschaften von Tiefgefriersperma untersucht.

Hierfür wurden Spermienproben von 10 gesunden Hunden mit oder ohne Vesikeln tiefgefroren und einer dritten Gruppe, die ohne Vesikel eingefroren wurde, nach dem Auftauen Vesikel zugesetzt. Die Proben dieser Gruppen wurden in bestimmten, zeitlichen Abständen nach dem Auftauen spermatologisch mittels Lichtmikroskop, CASA, HOS-Test, Spermac®-Färbung (Beurteilung der Pathomorphologie) und Eosin-Färbung (Lebend-Tot-Verhältnis) auf ihre Eigenschaften untersucht. In einem zweiten Versuch, dessen Absicht die Untersuchung einer möglichen Konzentrationsabhängigkeit der vesikulären Wirkung auf die Spermien war, wurden vesikelfreie Spermienproben aufgetaut, um nach dem Auftauen mit drei Vesikelmkonzentrationen versetzt zu werden. Die Motilitätseigenschaften der Keimzellen dieser drei Gruppen wurden mittels Lichtmikroskopie und CASA verglichen.

2 Literatur

2.1 Terminologie vesikulärer Strukturen im luminalen Kompartiment des männlichen Geschlechtstrakts

Für die Bezeichnung vesikulärer Strukturen, die sich als Sekretionsprodukte in der luminalen Flüssigkeit des Genitaltrakts männlicher Spezies befinden, werden in der Literatur unterschiedliche Begriffe verwendet. Sie setzen sich zumeist aus zwei Wortteilen zusammen. Der erste Wortteil bezieht sich dabei auf bestimmte vesikuläre Charakteristika. So geben die Begriffe „Prostasomen“ (abgeleitet von „Prostata“) (Brody et al. 1983), „Seminosen“ (abgeleitet von dem englischen Wort „semen“) (Aumüller et al. 1997), „Epididymosen“ (abgeleitet von „Epididymis“) (Yanagimachi et al. 1985) oder „Vesikulosomen“ (abgeleitet von „seminal vesicles“) (Agrawal 1987) Hinweise auf deren Ursprungsort. Die Bezeichnung „Aposomen“ (abgeleitet von apokrin) dagegen leitet sich von der Art des Sekretionsmechanismus ab (Aumüller et al. 1997; Rejraji et al. 2006). Der zweite Teil des Wortes, „-somen“, entstammt dem griechischen Wort „soma“ (Körper) und deutet die Eigenständigkeit der korpuskulären Struktur an.

Die Verwendung der Begriffe ist nicht einheitlich geregelt. Der Begriff „Prostasomen“, vereinzelt auch „Prostatosomen“ (Vanhoof et al. 1992), wird von vielen Autoren speziesspezifisch für die Bezeichnung der Vesikel im humanen Ejakulat genutzt, während Vesikel im Ejakulat anderer Spezies oft als „prostasomen-ähnliche Vesikel“ bezeichnet werden (Arienti et al. 1998a; Siciliano et al. 2008). Mit „prostasomen-ähnlichen Vesikeln“ können allerdings auch Vesikel derselben Spezies gemeint sein, die den Prostasomen morphologisch gleichen und sich in einem anderen Kompartiment des Geschlechtstrakts befinden. Rejraji et al. (2006) zum Beispiel bezeichnen murine Vesikel im Bereich des Vas deferens als „prostasomen-ähnliche Vesikel“ und nutzen auch für die Spezies Maus den Begriff „Prostasomen“ zur Beschreibung von Vesikeln im Ejakulat.

In weiten Teilen, vor allem der frühen Literatur, umfasst der Begriff „Prostasomen“ die Vesikelgesamtheit in der Samenflüssigkeit, weil man anfänglich annahm, dass die membranösen Partikel ausschließlich der Prostata entspringen. Seit der Entdeckung eines polytopen, vesikulären Ursprungs wird die Bezeichnung von vielen Autoren als kritisch betrachtet und die Eingrenzung der Begriffsbedeutung auf vesikuläre Strukturen aus der Prostata angeraten. Alternativ werden zur Umschreibung der Vesikelgesamtheit von Renneberg et al. (1997) Begriffe, wie „Seminosen“ oder „Aposomen“, vorgeschlagen. Die

gleiche Forschergruppe nutzt den Begriff „Aposomen“ allerdings in einer anderen Veröffentlichung ausschließlich speziesspezifisch zur Bezeichnung vesikulärer Sekretionsprodukte aus der dorsalen Prostata und der Koagulationsdrüse der Ratte (Aumüller et al. 1997). Rejraji et al. (2006) dagegen verwenden den Begriff „Aposomen“ weiter im Sinne der Vesikelgesamtheit im luminalen Kompartiment des männlichen Geschlechtstrakts.

Zusätzlich kursieren weitere Termini zur Bezeichnung der vesikulären Partikel aus dem Ejakulat in der Literatur, darunter „Mikrovesikel“, ein Begriff der vorwiegend für Vesikel aus Tumorzelllinien der Prostata gebraucht wird (Sandvig und Llorente 2012; Hosseini-Beheshti et al. 2012), oder „sekretorische Granula“ (Ronquist und Brody 1985; Collodel et al. 2012). Aufgrund ihrer Eigenschaften werden die vesikulären Strukturen auch der Gruppe der Exosomen zugeordnet. Dementsprechend sind sie in der Literatur ebenso unter diesem Begriff zu finden (Nilsson et al. 2009).

Die Begriffe „Epididymosomen“ zur speziesunabhängigen Beschreibung von Vesikeln aus dem Nebenhodenepithel und „Vesikulosomen“ zur Bezeichnung von bovinen Vesikeln aus der Samenblase werden dagegen in ihrer Bedeutung sehr einheitlich verwendet. Eine Ausnahme bilden Légaré et al. (1999), die Vesikel, die sie aus der Nebenhodenflüssigkeit des Hamsters isolieren, als „Prostasomen“ bezeichnen.

2.2 Gewinnung von vesikulären Strukturen

Die Gewinnung der sekretorischen Vesikel aus der Flüssigkeit des männlichen Genitaltrakts ist aufwendig und geschieht in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten. In der Literatur findet man zahlreiche Aufreinigungsprotokolle, die sich zwar in Details unterscheiden, aber größtenteils ein ähnliches Grundprinzip aufweisen. Auf die Darstellung von Details wird hier verzichtet, Einzelheiten bezüglich unterschiedlicher Protokolle und deren Schwierigkeiten werden in der Diskussion erwähnt.

Ausgangsmaterial für die Aufreinigung von seminalen Vesikeln ist das Ejakulat, im Falle von Epididymosomen oder Vesikulosomen jedoch die Sekretionsflüssigkeit aus entsprechenden, zuvor entnommenen Abschnitten des Geschlechtstrakts. Zu Beginn erfolgt die Absonderung von zellulärem Material aus der Probe per Zentrifugation. Der zellfreie, vesikelhaltige Überstand wird anschließend zur Konzentration der Vesikelprobe ultrazentrifugiert. Das resuspendierte Pellet enthält im Falle des Seminalplasmas neben Vesikeln amorphes Protein,

welches in einem weiteren Schritt abgetrennt werden muss. Dies erfolgt durch eine Gel-Permeations-Chromatographie, die am häufigsten auf der Basis eines mit Epichlorhydrin quervernetzten Dextrans, Sephadex G-200 (Stegmayr und Ronquist 1982a), durchgeführt wird.

Die Gelsäule, die für die Gel-Permeations-Chromatographie aus dem inerten, polymeren Material hergestellt wird, ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach unterschiedlicher Größe. Sehr kleine Proteinstrukturen können in zahlreiche Poren des Dextrannetzes eindringen und verbleiben länger in der Säule als sehr große Proteinpartikel, wie zum Beispiel die Vesikel, die bei Elution mit dem sogenannten Ausschlussvolumen, d.h. den ersten Fraktionen, die Säule verlassen.

Die Anwesenheit von Vesikeln aus dem Seminalplasma in diesen frühen Fraktionen lässt sich biochemisch auf unterschiedliche Weise nachweisen. Unter anderem dient hierzu die Untersuchung auf bestimmte Enzymaktivitäten, wie ATPase- (Stegmayr und Ronquist 1982a) oder Aminopeptidase N-Aktivität (Fabiani et al. 1994b), die für vesikuläre Strukturen aus der Prostata als charakteristisch angesehen werden und daher in den vesikelfreien Fraktionen nicht detektierbar sind. Aus den gewonnenen Fraktionen werden anschließend durch eine zweite Ultrazentrifugation die Vesikel isoliert.

Anstelle einer Gel-Permeations-Chromatographie kann auch eine diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation stehen.

2.3 Vesikel in der Sekretionsflüssigkeit des Genitaltrakts des Mannes

Die vesikulären Strukturen im humanen Ejakulat sind von allen Spezies am besten untersucht. Die Ergebnisse dienen immer wieder als Orientierung für Untersuchungen an anderen Spezies und werden oft zum Vergleich herangezogen. Daher beschäftigt sich der folgende Abschnitt ausführlich mit den Erkenntnissen aus dem humanen Bereich. Anschließend werden die in der Literatur vorliegenden Daten zu Vesikeln anderer Spezies behandelt. Aus Platzgründen beschränkt sich die Abhandlung auf die Darstellung der Situation bei den Haussäugetieren Kaninchen, Eber, Bulle, Schafbock, Hengst und Rüde.

2.3.1 Ursprung der Vesikel

Ebenso wie im Seminalplasma fanden Brody et al. (1983) auch im prostatistischen Gewebe einfache Vesikel und Speichervesikel (siehe 2.3.2.1). Aufgrund dieser Ähnlichkeit gingen

Brody et al. (1983) zunächst von einem rein prostatistischen Ursprung der Vesikel im Ejakulat aus und bezeichneten die vesikulären Partikel folglich als „Prostasomen“ (Brody et al. 1983). Eine spätere immunochemisch gestützte, transelektronenmikroskopische Untersuchung mit Hilfe eines polyvalenten Antiserums gegen aufgereinigte, native Vesikel aus dem humanen Ejakulat (Renneberg et al. 1997) ergab positive Reaktionen im apikalen Bereich des Epithels der Prostata sowie im Prostatalumen an intraluminalen sekretorischen Partikeln und bestätigte damit die Ergebnisse von Brody et al. (1983).

Verschiedene Studien, wie z.B. der Nachweis eines Mg^{2+} - und Ca^{2+} -abhängigen ATPase-Systems sowohl in Vesikelpollen als auch in der Prostataflüssigkeit (Ronquist et al. 1978b), der Nachweis einer sehr hohen, vesikelassoziierten Aktivität der Dipeptidylpeptidase IV (EC 3.4.14.5), ein Enzym, das im Hodengewebe nur eine sehr geringe Aktivität aufweist, in der Prostata dagegen aber sehr aktiv ist (Vanhoof et al. 1992), und die wissenschaftlich belegte Assoziation des Tissue Factors, der im Prostatasekret, nicht aber im Sekret der Samenblase vorhanden ist, mit den membranösen Partikeln (Fernandez et al. 1997) unterstützen indirekt die prostatistische Ursprungshypothese.

Weitere immunhistochemische Untersuchungen an anderen Geweben mittels Antikörpern gegen aufgereinigte, native Vesikel aus dem humanen Ejakulat zeigten jedoch, dass zugehörige Antigene (10-14 kDa bzw. 100 kDa) auch in Seminalflüssigkeit, Prostata, Nebenhoden, Samenblase und Spermien nachweisbar waren. Dies veranlasste die Forschergruppe um Renneberg (1997) zu der Vermutung des polytopen, vesikulären Ursprungs und sie schlugen daher den Begriff „Seminosen“ anstelle von „Prostasomen“ für die Bezeichnung der Vesikel vor. Diese Hypothese der Polytopie wird auch von Ergebnissen verschiedener anderer Forschergruppen unterstützt (Poliakov et al. 2009, Aalberts et al. 2012). Einzig die Samenblase scheint als Ursprungsorgan ausgeschlossen zu sein (Sahlén et al. 2010).

2.3.2 Vesikel aus dem Seminalplasma

2.3.2.1 Morphologie der Vesikel

Die rundlich-ovalen Vesikel aus dem humanen Ejakulat weisen eine tri-, penta- oder auch multilamelläre Membran auf und zeigen einen mittleren Durchmesser von etwa $150 \text{ nm} \pm 110 \text{ nm}$ bei einer Spannweite von 40-493 nm (Brody et al. 1983). Die Dichte dieser vesikulären Partikel liegt bei etwa 1,03 (Ronquist und Brody 1985). Im

transelektronenmikroskopischen Bild sind die Vesikel mit elektronendichtem Material gefüllt, was wahrscheinlich auf die Anwesenheit der Nukleotide ADP (Adenosindiphosphat) und GDP (Guanosindiphosphat) zurückzuführen ist (Ronquist und Frithz 1986).

Neben einfachen Vesikeln existieren im Seminalplasma sogenannte Speichervesikel, die in ihrem Innenraum zusätzlich zu elektronendichtem Material weitere (Tochter-) Vesikel beinhalten und von einer trilamellären Membran umgeben sind. Man unterscheidet Speichervesikel, die einfache Vesikel beinhalten, und multivesikuläre Speichervesikel, die wiederum kleinere Speichervesikel umfassen (Brody et al. 1983).

Poliakov et al. (2009) gehen von mindestens drei unterschiedlichen Vesikeltypen im Ejakulat gesunder Männer aus und vermuten auf dieser Basis eine typspezifische Funktionsverteilung. Sie teilen die Vesikel nach vier verschiedenen, morphologischen Kriterien ein: Die Zahl der ineinanderliegenden Vesikel („Multiplizität der Vesikel“), die Vesikelform, die Elektronendichte der Vesikelstruktur und deren Oberflächenstruktur. Demnach existiert Vesikeltyp 1 (dunkle Vesikel), der durch eine intravesikuläre Ansammlung von elektronendichtem Material, welches von Tochtervesikeln in den marginalen Vesikelbereich verdrängt wird, gekennzeichnet ist. Die dunklen Vesikel (Durchmesser 100-200 nm) besitzen eine glatte Oberfläche, sind rundlich bis länglich und machen etwa 50% der Vesikelgesamtheit aus. Vesikeltyp 2 (helle Vesikel, Durchmesser 50-200 nm) beinhaltet vesikuläre Partikel ohne elektronendichten Inhalt, die zahlreiche, blumenkohlartige, vermutlich proteinhaltige Protrusionen (Länge 5 nm) an ihrer Oberfläche aufweisen und etwa 25-30% der vesikulären Strukturen umfassen. Der dritte Vesikeltyp bildet eine Gruppe von Vesikeln mit glatter Oberfläche und einer länglichen Vesikelform (400 nm x 50-100 nm), die kein elektronendichtes Material besitzt.

Aalberts et al. (2012) untersuchten dagegen Proben von vasktomierten Probanden, womit sie das Vorkommen von epididymalen oder testikulären Vesikeln im Untersuchungsmaterial ausschlossen. Sie vermuten die Existenz von mindestens zwei prostatistischen Vesikeltypen mit ähnlicher Schwimmdichte (etwa 1,15 g/ml), die sich in Größe (56 ± 13 nm bzw. 105 ± 25 nm), Lipid- und Proteinzusammensetzung unterscheiden. Während in beiden Gruppen das Protein CD9, ein Exosomenmarker, und das Prostata-Stammzell-Antigen, das jedoch nur unregelmäßiger Vesikelbestandteil war, nachweisbar waren, fanden sich beispielsweise Unterschiede im Gehalt an GLIPR2 (Human glioma pathogenesis-related protein 2) und Annexin A1. GLIPR2, ein Protein, dem immunmodulatorische Funktionen zugeschrieben

werden (Eisenberg et al. 2002; Szyperski et al. 1998), war vor allem in den kleineren Vesikeln zu finden, während Annexin A1, das vielfältige Funktionen hat und an der Interaktion zwischen Spermien und Vesikeln beteiligt sein könnte (Gerke et al. 2005; Lim und Pervaiz 2007), ausschließlich oberflächlich auf den größeren Vesikeln vorkam. Im Hinblick auf die Ergebnisse von Poliakov et al. (2009) nimmt die Forschergruppe um Aalberts (Aalberts et al. 2012; Brouwers et al. 2013) an, dass die von ihnen beschriebenen, größeren Vesikel Bestandteil des Vesikeltyps 1 sind, während die kleineren Vesikel zum von Poliakov et al. (2009) etablierten Vesikeltyp 2 gehören.

Ronquist et al. (2012) dagegen lehnen trotz heterogener Morphologie der Vesikel eine Unterteilung in Vesikeltypen ab und postulieren die seminalen Vesikel als eine einheitliche Gruppe.

2.3.2.2 Sekretion der Vesikel

Hinsichtlich des Sekretionsmechanismus der Vesikel prostaticischen Ursprungs geht man von zwei unterschiedlichen Mechanismen aus, die nebeneinander vorkommen. Zum einen von einem exozytotischen Vorgang mit direkter Freisetzung von einzelnen Vesikeln ins Lumen, zum anderen von der sogenannten Diacytose, während welcher Speichervesikel unverändert aus der Zelle in den Extrazellarraum entlassen werden. Die Sekretion der prostaticischen Speichervesikel stellt somit einen Sonderfall dar. Diese Strukturen, die membranumschlossen innerhalb der Drüsenzelle vorkommen, werden offensichtlich mitsamt ihrer Membran unverändert sezerniert. Dieser Mechanismus kann weder durch den Vorgang der apokrinen Sekretion erklärt werden, bei welchem sich apikale Zellbereiche von der Zelle lösen, noch dient das Modell der merokrinen Sekretion (= Exocytose) als hinreichende Erklärung für die Ausschleusung der Vesikel. Ronquist et al. (1985) beobachteten intakte Speichervesikel, die im transelektronenmikroskopischen Bild im Grenzbereich zwischen Extrazellulär- und Intrazellularraum gelegen waren und eine Diskontinuität der Zellmembran zur Folge hatten. In der Annahme, dass es sich dabei um den Sekretionsvorgang der Speichervesikel handeln könnte, bezeichneten sie die Abgabe der Vesikel als Diacytose. Die Tatsache, dass keine Anzeichen für Fusionsvorgänge zwischen den Membranen der Drüsenzelle und der Speichervesikel feststellbar waren und dass die Speichervesikel sowohl intra- als auch extrazellulär anzutreffen waren, untermauerte diese

Hypothese (Brody et al. 1983). Trotzdem bleiben viele Details zur vesikulären Sekretion bislang ungeklärt.

2.3.2.3 Biochemie der Vesikel

2.3.2.3.1 Proteom der Vesikel

Bei Auftrennung des Ejakulats in Spermienzellen, Vesikel und eine lösliche Fraktion entfallen 7% des Gesamt-Ejakulatproteins auf die Spermien und nur 3% auf die vesikulären Partikel. Der restliche Proteinanteil findet sich in der löslichen Fraktion, deren elektrophoretisches Auftrennungsmuster sich stark von demjenigen der Vesikel unterscheidet (Arienti et al. 1999b).

Das Proteinmuster der Vesikel aus dem Ejakulat ist komplex. Die elektrophoretische Auftrennung der humanen Vesikelproteine weist mehr als 20 unterschiedliche Banden auf. Dieses Muster bleibt auch nach Ultraschall- und Gefrierbehandlung der Probe konstant (Ronquist und Brody 1985). Insgesamt konnten bisher mehr als 440 verschiedene Proteinstrukturen identifiziert werden. Darunter finden sich unter anderem Enzyme, Transport- und Strukturproteine, GTP-Proteine, Chaperone und Signaltransduktionsproteine. Eine umfassende Auflistung der einzelnen Proteinstrukturen findet sich in der Publikation von Poliakov et al. (2009), die durch weitere Forschungsergebnisse anderer Forschergruppen ergänzt wird (Utleug et al. 2003; Ronquist et al. 2013c; Stark et al. 2004).

Verschiedene Proteine, wie z.B. eine Mg^{2+} - und Ca^{2+} -abhängige ATPase (Ronquist et al. 1978b), die Dipeptidylpeptidase IV (CD26) (Vanhoof et al. 1992; Schrimpf et al. 1999), die Zink-abhängige Aminopeptidase N (CD13; EC 3.4.11.2) (Laurell et al. 1982), eine neutrale Endopeptidase (Enkephalinase, CD10, EC 3.4.24.11) (Renneberg et al. 2001) sowie Granulophysin (Skibinski et al. 1994), die stets in Assoziation mit Prostasomen bzw. mit den Vesikeln aus dem humanen Ejakulat nachgewiesen werden können, gelten als „Prostasomenmarker“.

Des Weiteren gehören verschiedene Neuropeptide zu den typischen, vesikulären Bestandteilen, darunter das oben erwähnte Granulophysin (Skibinski et al. 1994) bzw. Synaptophysin, das als Marker für neuroendokrine Zellen und Neurone gilt (Wiedenmann und Franke 1985), Chromogranin A und B, das Neuropeptid Y sowie das vasoaktive intestinale Polypeptid (Stridsberg et al. 1996). Auffällig ist zudem ein hohes Chromogranin B/A- Verhältnis in den Vesikeln (Stridsberg et al. 1996).

2.3.2.3.2 Lipidom der Vesikel

Die Lipidmuster von Spermienzellen, vesikulären Strukturen und der restlichen löslichen Fraktion des Ejakulats weisen ebenfalls große Unterschiede auf. Während nur 15% des Gesamtlipidphosphorgehalts auf die Vesikel entfallen, beinhaltet letztere Fraktion 45% des im Ejakulat vorhandenen Cholesterols. Daher besitzen Prostatasomen ein sehr hohes Cholesterol-Phospholipid-Verhältnis (siehe Tab. 1). Dies steht im Kontrast zu der Fraktion der Spermienzellen, die zwar 46% des Gesamtlipidphosphors umfasst, aber nur wenig Cholesterol enthält und infolgedessen ein sehr niedriges Cholesterol-Phospholipid-Verhältnis zeigt (siehe Tab. 1) (Arienti et al. 1999b).

Betrachtet man die Zusammensetzung der Phospholipide, fällt auf, dass die Vesikel im Gegensatz zu den Spermien nur wenig Phosphatidylcholin aufweisen, ein Lipid, das in Spermienzellen mit einem Anteil von 36% dominant ist (Arienti et al. 1999b). Die vesikulären Partikel sind dafür sehr reich an Sphingomyelin, das etwa 50% des Phospholipidanteils ausmacht. Darüber hinaus verfügen die vesikulären Partikel über einen sehr hohen Gehalt an Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin sowie Lyso-Phospholipiden. Phosphatidylinositol ist dagegen nur in sehr geringem Maß vertreten (Arvidson et al. 1989; Arienti et al. 1997c; Arienti et al. 1999b). Brouwers et al. (2013), die wie oben erwähnt, die Vesikelpopulation in zwei Subpopulationen unterteilten (50 nm bzw. 100 nm), fanden zudem in den kleineren Vesikeln einen sehr hohen Gehalt an Monohexosylceramiden (23,6 Molprozent des Gesamtlipidgehaltes), die dafür weniger Sphingomyelin enthielten (14,3 Molprozent des Gesamtlipidgehaltes). Der Cholesterolgehalt lag bei ihren Untersuchungen etwa bei 55 Molprozent des Gesamtlipidgehaltes (Brouwers et al. 2013).

Hinsichtlich der Fettsäurezusammensetzung bestehen die vesikulären Glycerolipide hauptsächlich aus Palmitin-, Stearin- und Ölsäure, während Sphingomyelin zu etwa 1/3 aus Palmitinsäure aufgebaut ist und daneben insbesondere C18-C24 gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren enthält (Arvidson et al. 1989). Diese besondere Lipidzusammensetzung der Vesikel erklärt unter anderem die hohe Resistenz der stark geordneten Membran gegen mechanische Einflüsse (Arvidson et al. 1989).

Mehrere Untersuchungen beschäftigten sich bisher mit der Ermittlung des Lipidgehalts der Vesikel. Die wichtigsten Ergebnisse einiger Forschergruppen sind in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1: Lipidom der humanen Vesikel im Vergleich zu humanen Spermienzellen

Vesikuläre Strukturen des Ejakulats				Spermien
Quelle	Quelle 1	Quelle 2	Quelle 3	Quelle 2
Lipidsubstanzen				
Cholesterol in $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Protein	0,8	0,537	0,46-0,67	0,058
Gesamt-Lipidphosphor in $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Protein	0,4	0,223	0,23-0,29	0,26
Cholesterol- Phospholipid-Verhältnis	2	2,2	1,88-2,31	0,27
Phospholipidsubstanzen in% des Gesamtlipidphosphoranteils				
Phosphatidylethanolamin	15	11	15,5-20	30
Phosphatidylcholin	12	20	7,9-8,3	36
Sphingomyelin	53	50	40,9-48,5	24
Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol	20	20	13,7-17,2	11

Quelle 1= Arienti et al. 1997c; Quelle 2= Arienti et al. 1999b; Quelle 3= Arvidson et al. 1989

2.3.2.3.3 Nukleinsäuren

In Assoziation mit den Vesikeln findet sich eine deutliche Anreicherung von Nukleinsäuren im Vergleich zum Seminalplasma (Nukleinsäure-Protein-Verhältnis 1:100 bzw. 1:1000). Olsson et al. (1990) fanden Nukleinsäuren einer Größe von 200 bis 20000 bp und vermuteten auf der Basis ihrer Studien eine oberflächliche Assoziation der Vesikel mit doppelsträngiger DNA. Neuere Untersuchungen gehen dagegen von einem intravesikulären Gehalt an chromosomaler DNA aus (Ronquist 2009). Diese DNA besteht den Forschungsergebnissen von Ronquist et al. (2009; 2011) zufolge aus zufällig ausgewählten Bruchteilen des humanen Genoms und kann auf Spermien übertragen und vermutlich auch von diesen internalisiert werden. Der Transfer geschieht dabei vor allem auf die Kopfregion der Keimzellen. Die Forschergruppe um Aalberts (2014) äußert sich bezüglich dieser Ergebnisse in einem aktuellen Review jedoch sehr skeptisch und gibt die Möglichkeit einer Ko-Isolierung von DNA-haltigen apoptotischen Vesikeln mit den vesikulären Strukturen zu bedenken.

Zudem befindet sich ein Großteil der mRNA aus dem zellfreien Seminalplasma intravesikulär (Li et al. 2012b). Die Mehrheit der microRNA-Strukturen des zellfreien Seminalplasmas,

nicht-codierende RNA-Strukturen, die vor allem im Rahmen der Genregulation eine Rolle spielen (Bartel 2004), dagegen ist an freie Proteinkomplexe gebunden. Nur ein kleiner Teil ist in den Vesikeln enthalten (Li et al. 2012b). Trotzdem können die vesikulären Partikel auf diese Weise wahrscheinlich ebenfalls Informationen auf andere Zellen übertragen (Aalberts 2010). Das microRNA-Profil von normalen vesikulären Partikeln gleicht weitgehend dem Profil der Vesikel aus prostaticen Tumorzelllinien (siehe 2.3.4). Kleine, regelmäßige Unterschiede sind jedoch festzustellen. Dies führte Hessvik et al. (2012) zu der Schlussfolgerung, dass die microRNA vor dem Verpacken und Freisetzen vermutlich sortiert wird. Die Tatsache, dass das microRNA-Profil der Vesikel aus dem Ejakulat nach Vasektomie verändert erscheint und bestimmte microRNA-Strukturen fehlen, die eine Rolle bei der Spermienreifung spielen, deutet zum einen darauf hin, dass nicht nur Vesikel prostaticen Ursprungs, sondern auch Epididymosomen microRNA tragen. Zum anderen sehen Belleannée et al. (2013b) hierin einen möglichen Pool an Biomarkern zur Kontrolle einer erfolgreichen Vasovasostomie, nach welcher die fehlenden, fertilitätsrelevanten microRNA-Strukturen im Ejakulat wieder vorhanden sein müssten.

2.3.2.3.4 Ionengehalt der Vesikel

Die vesikulären Strukturen zeigen hohe Konzentrationen verschiedener zweiwertiger Kationen, wie zum Beispiel Ca^{2+} -, Zn^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen (Stegmayr et al. 1982d) und sind fähig, Zn^{2+} -Ionen auch entgegen von Gradienten aus der Umgebung zu binden (Vivacqua et al. 2004).

2.3.2.4 Interaktion der Vesikel mit ihrer Umgebung

Vesikel interagieren sowohl untereinander als auch mit Strukturen ihrer Umgebung, wie Spermien oder Entzündungszellen, auf unterschiedliche Weise. Dies soll im folgenden Abschnitt dargelegt werden.

2.3.2.4.1 Intervesikuläre Interaktion

Bordi et al. (2001) konnten im Zeitverlauf eine pH-abhängige Vergrößerung des Vesikelradius feststellen, die in saurem Milieu stattfand, nicht jedoch bei höheren pH-Werten. Auch Girasole et al. (2003) berichten über eine Zunahme des Vesikeldurchmessers in saurem Milieu um etwa das Doppelte. Daher wird angenommen, dass Vesikel miteinander

fusionieren. Bordi et al. (2001) vermuten in der vesikulären Selbstfusion ein vesikeleigenes Kontrollsystem für die Interaktion der Vesikel mit den Keimzellen.

2.3.2.4.2 Interaktion der Vesikel mit Spermien

2.3.2.4.2.1 Adhäsion, Fusion und Transfer

Bei Inkubation von Spermien mit Vesikeln zeigt sich ultrastrukturell eine Anreicherung der vesikulären Partikel im Bereich der Spermienköpfe (Ronquist et al. 1990) und im Bereich des Mittelstücks (Allegrucci et al. 2001a). Die vesikulären Strukturen bedecken dabei nicht nur die Spermienoberfläche, sondern gehen, wie oben erwähnt, auch untereinander Verbindungen ein. Als Kontaktbasis werden hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Komponenten vermutet, wobei Van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen nicht ausgeschlossen werden (Ronquist et al. 1990).

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit der Fusion zwischen Vesikeln und humanen Spermien. Diese Art der Interaktion ist pH- und proteinabhängig. Sie erfolgt bevorzugt bei einem Umgebungs-pH-Wert von 4-5, nicht jedoch bei pH 7,5. Außerdem geschieht sie unabhängig von der Umgebungskonzentration zweiwertiger Kationen, wie Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} oder Zn^{2+} (0,1–2 mmol/l) (Arienti et al. 1997a).

Vermutlich werden sowohl bei Adhäsion von Vesikeln an Spermien (Rooney et al. 1996) als auch bei deren Fusion vesikeleigene Komponenten, darunter Proteine, Lipide und Nukleinsäuren, auf die Keimzellen übertragen. Dies führt unter anderem zu einer veränderten Zusammensetzung der Spermienzellmembran, was weitere Vorgänge, wie zum Beispiel die Kapazitation oder die Akrosomreaktion der Spermien, beeinflussen kann. Generell sind Interaktionen zwischen den genannten Komponenten sowohl wie oben beschrieben im sauren Milieu (z.B. Fusion) als auch bei neutralem oder alkalischem pH-Wert (z.B. Substanztransfer) möglich (Pons-Rejraji et al. 2011).

Die Fusion hat eine deutliche Abnahme der Spermienmembranfluidität zur Folge, wobei das Ausmaß des übertragenen Lipidanteils und damit der Fluiditätsveränderung vom Spermien-Vesikel-Verhältnis abhängt (Carlini et al. 1997). Bei Anwesenheit von künstlich hergestellten Liposomen (N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N, N, N-Trimethylammonium; 1,2-Dipalmytoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin) wird der Lipidtransfer bzw. die vesikuläre Fusion mit den Spermien jedoch verringert oder sogar unterbunden. Dies könnte eine Möglichkeit

darstellen, die Spermienkapazitation und –akrosomreaktion in vitro zu modulieren (Palmerini et al. 2006).

Des Weiteren werden bei Inkubation von Spermien und Vesikeln vesikelspezifische Enzyme, wie die zink-abhängige Aminopeptidase N (EC 3.4.11.2) (Arienti et al. 1997b; Arienti et al. 1997c) oder die Dipeptidylpeptidase IV (CD26, EC 3.5.4.4) (Arienti et al. 1997d), die den Spermien normalerweise fehlen, übertragen. Für zahlreiche weitere Substanzen finden sich in der Literatur TransfERNachweise, die jedoch hier nicht im Einzelnen aufgeführt werden sollen.

Die Fusion der Vesikel mit den Spermien löst neben dem Transfer verschiedener Vesikelkomponenten einen intrazellulären Calciumeinstrom in die Keimzelle aus (Palmerini et al. 1999). Der vesikelinduzierte Calciumeinstrom geschieht unabhängig und additiv zum Progesteron-induzierten Calciumeinstrom (Arienti et al. 2001), der sowohl im Rahmen der Spermienmotilität als auch bei der Akrosomreaktion eine wichtige Rolle spielt (Lishko et al. 2011; Strunker et al. 2011). Spermien, die zuvor mit Vesikeln fusioniert sind, reagieren stärker auf den Stimulus Progesteron als andere (Arienti et al. 2001). Die Anwesenheit von Stickstoffmonoxid verstärkt dabei den additiven Effekt der Vesikel auf die Progesteronantwort (Arienti et al. 2002). Die additiven Effekte der Fusion sowie des Stickstoffmonoxids im Zusammenhang mit dem Progesteronstimulus fehlen bei Varikozele-Patienten, was eventuell eine Ursache für deren reduzierte Fertilität sein könnte (Zucchi et al. 2006). Für den oben beschriebenen Vorgang ist der Transfer verschiedener Rezeptoren und Enzyme, wie z.B. Progesteronrezeptoren, Ryanodinrezeptoren oder zyklische ADP-Ribose synthetisierende Enzyme, von den Vesikeln auf die Halsregion der Spermien essentiell (Park et al. 2011). Auf Basis dieser molekularen Grundlagen lassen sich die Ergebnisse der Forschergruppe um Palmerini (2003) erklären, die nur bei Inkubation von Spermien mit Progesteron und Vesikeln einen erhöhten Anteil an akrosomreagierten Spermien feststellen konnten, nicht aber bei Inkubation von Spermien mit reinem Progesteron. Der Mechanismus hinter dieser Interaktion ist nicht vollständig geklärt. Allerdings könnten die vesikulären Proteinkinasen durch Phosphorylierung und damit einhergehender Verdickung der Vesikelmembran eine Rolle spielen. Die Phosphorylierung zieht eine Veränderung der membranösen Eigenschaften nach sich (Rozengurt et al. 1977), die zugunsten von exocytotischen oder Fusionsvorgängen stattfinden könnte (Stegmayr et al. 1982c).

2.3.2.4.2.2 Vesikulärer Einfluss auf die Spermienmotilität

Mehrere Studien belegen einen förderlichen Effekt der Vesikel auf die Spermienmotilität (Stegmayr und Ronquist 1982a, 1982b, Arienti et al. 1999a). Dabei zeigen vor Inkubation erhitzte Vesikel ($\geq 80^{\circ}\text{C}$) eine höhere Wirkung als unbehandelte Partikelproben (Oliw et al. 1993; Fabiani et al. 1994a; Fabiani et al. 1994b). Dies lässt vermuten, dass enzymatische Vorgänge seitens der Vesikel nicht entscheidend zu diesem Mechanismus beitragen. Insbesondere der Anteil progressiv beweglicher Spermien, der Anteil hyperaktiver Spermien und der Parameter der Amplitude der lateralen Kopfbewegung (ALH) werden durch die Anwesenheit der vesikulären Strukturen positiv beeinflusst (Fabiani et al. 1994a). Das vesikuläre Konzentrationsoptimum bei Inkubation von Spermien mit Vesikeln ohne weiteren Zusatz anderer Substanzen liegt bei 0,7-0,8 mg Vesikelprotein/ml (Fabiani et al. 1994b). Eine Zugabe von verschiedenen Hexosen (5 mmol/l), wie z.B. Fructose, Glucose oder Mannose, zu vesikel- oder albuminhaltigen Ansätzen von Spermien führt zu einer zeitlichen Verlängerung (≥ 3 Stunden) des positiven Effekts auf die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien (Fabiani 1995a). Dies basiert eventuell auf der Bildung von ATP (Adenosintriphosphat) mittels Glykolyse durch die Spermien (Fabiani 1995a), möglicherweise zum Teil auch durch die vesikulären Partikel (Ronquist et al. 2013b). Adenin hat bei Zugabe zu vesikel- und glucosehaltigen Versuchsansätzen eine Stimulation der Geschwindigkeitsparameter der Spermien zur Folge. Dieser Effekt tritt sehr schnell nach Inkubationsstart ein, sodass die direkte Wirkung von Adenin über einen Rezeptor vermutet wird (Fabiani 1995a). Während Zinkionen im Zusammenhang mit dem vesikulären Einfluss auf die Spermienmotilität keine Relevanz zu haben scheinen, wird Magnesium- und Calciumionen eine bedeutende Rolle zugeschrieben (Fabiani 1995a).

Auch bei der Isolation von motilen Spermien aus Tiefgefriersperma mittels Swim-Up-Verfahren wirkt sich die Anwesenheit von Vesikeln positiv aus und führt zu höheren Ausbeuten (Carlsson et al. 1997).

Der dem Effekt der Spermien-Vesikel-Interaktion zugrunde liegende molekulare Mechanismus hinsichtlich des Einflusses auf die Spermienmotilität ist nicht vollständig erforscht. So ziehen Stridsberg et al. (1996) eine Rolle des vesikulären VIP (Vasoaktives intestinales Peptid) in Betracht, das als Induktor der cAMP (zyklisches

Adenosinmonophosphat)-Bildung der Spermien zur gesteigerten Spermienmotilität beitragen könnte.

Daneben werden zahlreiche weitere Vesikelkomponenten im Zusammenhang mit der Spermienmotilität diskutiert. Neben Fibronektin (Aumüller et al. 1997) könnte das vesikelgebundene Enzym 5'-Nukleotidase (Fabiani und Ronquist 1993, 1995a; Aumüller et al. 1997) die Spermienmotilität fördern. Die 5'-Nukleotidase katalysiert die Bildung von Adenosin, welches wiederum an spezifischen Adenosin-A₂-Rezeptoren der Spermien wirksam ist und so die Motilität positiv beeinflusst (Shen et al. 1993). Ebenso besteht die Möglichkeit, dass die vesikuläre DPP IV (Dipeptidylpeptidase IV) über eine Spaltung von Substanz P zur Regulation des Acetylcholins beiträgt (Schrimpf et al. 1999) und damit eine Rolle bei der Beeinflussung der Spermienmotilität spielt (Bray et al. 2005).

Auch die Enkephalin-abbauenden Enzyme Aminopeptidase N (EC 3.4.11.2) und Neutrale Endopeptidase 24.11 (EC 3.4.24.11) scheinen eine regulierende Wirkung im Rahmen der Spermienmotilität zu haben. Die Studienergebnisse diesbezüglich sind allerdings kontrovers. So soll sich die Inhibition beider Enzyme förderlich auf die Spermienmotilität auswirken (Subiran et al. 2008 May; Fernández et al. 2002). Andererseits berichten Irazusta et al. (2004) zwar über eine signifikant positive Korrelation zwischen dem Anteil toter Spermien und der Aminopeptidase N-Aktivität, fanden jedoch gleichzeitig eine signifikant negative Korrelation zwischen dem Anteil immotiler Spermien und der Aminopeptidase N-Aktivität. Dies veranlasste sie zu der Annahme, dass Aminopeptidase N eine motilitätsfördernde Wirkung auf die Spermien haben muss.

Da Ap3A und Ap4A die Spermienmotilität negativ beeinflussen (Chan et al. 1991) und die Vesikel eine Hydrolase (Ekto-Diadenosin-Polyphosphat-Hydrolase) für deren Spaltung, die sie auf die Keimzellen transferieren können, auf ihrer Membran tragen (Minelli et al. 2002 Apr 1), zieht man eine Beteiligung dieses Enzyms bei der vesikulären Wirkung auf die Spermienmotilität ebenfalls in Betracht.

2.3.2.4.2.3 Vesikulärer Einfluss auf Kapazitation und Akrosomreaktion der Spermien

Laut Pons-Rejraji et al. (2011) inhibieren Vesikel aus dem Ejakulat die Kapazitation sowie die spontane Akrosomreaktion der Spermien. Der genaue Mechanismus dieser Vesikel-Spermien-Interaktion ist ebenfalls unklar. Grundlage dafür ist vermutlich unter anderem der membranstabilisierende, vesikuläre Transfer von Lipidsubstanzen, vor allem von Cholesterol,

auf die Keimzellen. Außerdem bewirkt die Anwesenheit der Vesikel eine Reduktion der Tyrosinphosphorylierung verschiedener Spermienproteine, wie zum Beispiel von den Kapazitationsmarkern P110 und P80. Während der intrazelluläre pH-Wert durch die Vesikel unbeeinflusst bleibt, wurde zusätzlich ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration der Spermien in Anwesenheit der Vesikel beobachtet, welche vermutlich ebenfalls im Zusammenhang mit den genannten Vorgängen steht (Bechoua et al. 2011). Als weitere vesikuläre Einflussfaktoren auf die Akrosomreaktion werden die Substanzen Neuropeptid Y (Stridsberg et al. 1996) und (n-6)-Lipoxygenase diskutiert (Oliw et al. 1993).

Während Palmerini et al. (2003) über eine Induktion der Akrosomreaktion durch die vesikulären Strukturen berichten, postulieren Pons-Rejraji et al. (2011), dass diese Ergebnisse durch die Studienbedingungen (pH-Wert 5,5) verfälscht sind. Interessant in diesem Zusammenhang ist allerdings der hohe Phospholipase-A2-Gehalt der Vesikel (Lindahl et al. 1987), weil dieses Enzym essentiell für den Ablauf der Akrosomreaktion ist (Dominguez et al. 1999; Pietrobon et al. 2005) und eine niedrige Phospholipase-A2-Konzentration im Spermienkopf mit Infertilität assoziiert wird (Wang et al. 2003). Inwieweit der Phospholipase A2-Gehalt der Spermien allerdings von einem vesikulären Transfer abhängt bzw. ob dieses Enzym überhaupt übertragen wird, ist ungeklärt.

TRH (*Thyreotropin Releasing Hormon*)-abbauende Enzyme, die in den Vesikeln vorkommen (Valdivia et al. 2004), werden ebenfalls als Modulatoren der Spermienphysiologie, insbesondere der Kapazitation, diskutiert (Green et al. 1996).

2.3.2.4.3 Vesikulärer Einfluss auf das Immunsystem

Die seminalen Vesikel beeinflussen darüber hinaus das Immunsystem und interagieren mit Blutzellen. So können sie nicht nur mit polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten in Kontakt treten (Saez et al. 2000; Arienti et al. 1998b), sondern auch mit Erythrozyten (Babiker et al. 2002; Babiker 2005), mononukleären Leukozyten (Arienti et al. 1998b) und Lymphozyten (Kelly et al. 1991). Im Fall von neutrophilen Granulozyten und Monozyten findet allerdings keine Fusion der Strukturen wie bei den Spermien statt, sondern lediglich eine pH-abhängige Adhäsion (Arienti et al. 1998b). Für Makrophagen, nicht jedoch für Erythrozyten, ist im Anschluss an diese Adhäsion eine Internalisierung der Vesikel durch die Immunzellen beschrieben (Rooney et al. 1996; Skibinski et al. 1992).

Die Vesikel führen zu einer Inhibition der mitogen-induzierten Lymphozytenproliferation und einer reduzierten Phagozytoserate von Monozyten und polymorphkernigen Neutrophilen. Die Tatsache, dass dieser Effekt auch bei zuvor erhitzten Vesikelpuben eintrat, deutet darauf hin, dass Enzymaktivitäten in diesem Zusammenhang keine oder eine untergeordnete Rolle spielen (Kelly et al. 1991; Skibinski et al. 1992). Darüber hinaus reduziert die Anwesenheit der Vesikel in vitro die Superoxidanionbildung durch die Immunzellen (Skibinski et al. 1992).

Während Kelly et al. (1991) keinen Effekt der Vesikel auf die Natürlichen Killerzellen (NK) beobachten konnten, beschreiben Tarazona et al. (2011) eine verminderte Aktivität von NK bei Inkubation mit Vesikeln in vitro. Diese äußert sich auf molekularer Ebene unter anderem in einer Downregulation von bestimmten NK-aktivierenden Rezeptoren (CD244). CD48, ein Ligand von CD244-Rezeptoren, ist vesikulärer Bestandteil und wahrscheinlich zumindest teilweise mitverantwortlich für die beschriebene Wirkung.

Neben den Substanzen CD10 (Enkephalinase), CD13 (Aminopeptidase N), CD26 (Dipeptidylpeptidase IV) und CD48 finden sich weitere CD-Moleküle auf der vesikulären Oberfläche. Dazu gehören CD46 (Membrane Cofactor Protein), das die Komplementfaktoren C3b und C4b bindet, CD55 (Decay-accelerating factor), das mit Komplementfaktor C5 interagiert, sowie der Komplementinhibitor CD59, der die Bildung des Membran-attackierenden Komplexes (MAC) durch die Bindung von Komplementfaktor C9 verhindert, und CDw52. Alle Substanzen schützen ihre zellulären Träger vor einer Lyse durch das Komplementsystem. Es ist nachgewiesen, dass diese Substanzen von den Vesikeln auf andere Zellen übertragen werden können (Rooney et al. 1993; Simpson und Holmes 1994; Kitamura et al. 1995; Rooney et al. 1996; Babiker 2005).

So kommt den vesikulären Strukturen zum einen eine Schutzfunktion zu, weil zum Beispiel Spermien vor Angriffen des weiblichen Immunsystems bewahrt werden können, zum anderen wird jedoch auch diskutiert, ob pathogene Organismen oder Tumorzellen ebenfalls von einem Substanztransfer profitieren könnten (Kelly et al. 1991; Rooney et al. 1996).

2.3.2.4.4 Vesikulärer Einfluss auf die Blutkoagulation

Der Gewebefaktor (Tissue factor), eine wichtige prokoagulatorische Komponente, die mit Faktor VII des extrinsischen Blutkoagulationssystems interagiert und zur Initiation der Blutkoagulation beiträgt (Nemerson 1988), kommt ebenfalls in Assoziation mit den

seminalen Vesikeln vor. Es wird diskutiert, ob die Vesikel auf diese Weise bei Vorkommen von Blutungen während der Kopulation den Eintritt von Substanzen, wie z.B. infektiösen Erregern oder auch Keimzellen, die zur Bildung von Antikörpern und in Folge eventuell sogar zu einer Infertilität männlicher Individuen führen würden, in den Blutkreislauf verhindern (Fernandez et al. 1997).

2.3.2.4.5 Antibakterielle Wirkung der Vesikel

Die Vesikel aus dem menschlichen Ejakulat zeigen einen inhibierenden Effekt auf das Wachstum verschiedener Bakterienstämme, darunter *Bacillus megaterium* (Carlsson et al. 2000a). Die biochemischen Grundlagen der antibakteriellen Vesikelwirkung sind nicht vollständig erforscht. Neben Chromogranin A und B, die Bestandteil der Vesikel sind (Stridsberg et al. 1996) und deren Fragmente einen wachstumsinhibierenden Effekt auf Bakterien haben (Metz-Boutigue et al. 1998), kommt auch hCAP-18 (Human cationic antimicrobial protein) als mögliche Grundlage für die antibakterielle Wirkung der vesikulären Partikel in Frage. Das Cathelicidin hCAP-18 ist Bestandteil der vesikulären Membran und könnte ebenfalls durch die Freisetzung des Peptids LL-37 für den antimikrobiellen Effekt verantwortlich sein. Andersson et al. (2002) ziehen einen Transfer des Proteins zusammen mit Cholesterol von den Vesikeln auf die Spermien in Betracht, die dadurch vor toxischen Effekten des Peptids LL-37 geschützt wären. Außerdem wurde das Lipopolysaccharid-bindende Protein (LBP), das normalerweise über eine Bindung an gramnegative Bakterien Entzündungszellen des Körpers zur Bakterienabwehr stimuliert, in Assoziation mit den Vesikeln nachgewiesen und könnte somit ebenfalls in den Prozess der mikrobiellen Abwehr eingebunden sein (Malm et al. 2005).

Die Möglichkeit eines therapeutisch-antibakteriellen Einsatzes von Vesikeln aus dem Ejakulat wird aufgrund der vorliegenden Erkenntnisse nicht ausgeschlossen (Carlsson et al. 2000a).

2.3.2.4.6 Antivirale Wirkung der Vesikel

Eine Studie von Kitamura et al. (1995) belegt die Inhibition der zytopathogenen Aktivität eines Masernvirus durch die Vesikel *in vitro*. Eine Rolle des vesikulären Proteins CD46 wird spekuliert. Der molekulare Hintergrund ist jedoch unbekannt.

2.3.2.4.7 Antioxidative Wirkung der Vesikel

Die vesikulären Partikel wirken bei Inkubation mit polymorphkernigen Neutrophilen inhibitorisch auf die Produktion von reaktiven Oxygen-Spezies. Der zugrundeliegende Mechanismus schließt vermutlich eine Reduktion der NADPH-Oxidase-Aktivität ein. Diese basiert höchstwahrscheinlich auf dem Lipidtransfer von den Vesikeln auf die Immunzellen, wodurch deren membranöses Lipidmuster verändert wird (Saez et al. 1998, 2000). Weiterhin wird Lykopen, eine antioxidativ wirkende Substanz, mit den Vesikeln im Seminalplasma transportiert (Goyal et al. 2006). Lykopen wirkt nach neuesten Erkenntnissen im Übrigen positiv auf verschiedene Eigenschaften von aufgetautem Tiefgefriersperma, wie beispielsweise auf die progressive Spermienmotilität und den Gesamtanteil motiler Spermien (Bucak et al. 2014).

2.3.2.4.8 Energiegewinnung durch die Vesikel

Humane Vesikel verfügen auf Grundlage von Hexosen, wie Glucose oder Fructose, über die Möglichkeit der ATP-Bildung. Dafür besitzen sie auf ihrer Oberfläche verschiedene Enzyme, die mit der anaeroben Glykolyse in Zusammenhang stehen, darunter auch Adenylatkinase, 5'-Nukleotidase und Hexose-Transporter (Ronquist et al. 2013b; Ronquist et al. 2013c). Aufgrund einer hohen ATPase-Aktivität ist die Netto-ATP-Ausbeute jedoch gering (Ronquist et al. 2013b; Ronquist et al. 2013c). Hinsichtlich der Bedeutung des extrazellulären ATPs bzw. der besonderen, vesikulären Enzymausstattung gibt es verschiedene Vermutungen von Ronquist et al. (2013b; 2013). Unter anderem könnte das vesikuläre, extrazelluläre ATP über einen purinergen Rezeptor P2 die akrosomale Exocytose beeinflussen (Foresta et al. 1992). Die Enzymausstattung der Vesikel könnte aber ebenso auf die Spermien transferriert werden und so z.B. auf die Spermienmotilität einwirken (Mukai und Okuno 2004). Eine wissenschaftlich belegte Bestätigung der zahlreichen Hypothesen steht jedoch bislang aus.

2.3.2.4.9 Vesikulärer Einfluss auf die Sol-Gel-Sol-Transition des Ejakulats

Die vesikulären Partikel scheinen auch in den Prozess der Bildung des Spermakoagulum nach der Ejakulation eingebunden zu sein, denn etwa die Hälfte der Proteinkinase-Aktivität des Seminalplasmas (PKA und PKC), die für die Phosphorylierung von Semenogelinen verantwortlich ist, findet sich in Assoziation mit den Vesikeln (Ek et al. 2002). Außerdem

besitzen die vesikulären Strukturen eine Zn^{2+} -abhängige Peptidase, die ebenfalls im Rahmen der Sol-Gel-Sol-Transition aktiv sein könnte (Laurell et al. 1982).

2.3.2.4.10 Vesikulärer Einfluss auf Tumorzelllinien

Vesikel aus dem Seminalplasma von gesunden Probanden inhibieren bei Inkubation mit Zellen aus den Tumorzelllinien DU145, PC3 und LNCaP deren Wachstum auf Proteingrundlage. Dieser wachstumsinhibierende Effekt ist bei alleiniger Zugabe von vesikelfreiem Seminalplasma ebenfalls vorhanden, aber deutlich schwächer ausgeprägt und basiert hier vermutlich auf der Anwesenheit von Ionen (Carlsson et al. 2000b). Daneben werden die vesikulären Strukturen allerdings auch als Initiatoren der Tumorbildung diskutiert, weil ihre hydrolytische Enzymausstattung durch Schädigung von Zellkomponenten die Tumorentstehung begünstigen könnte (Tappel 2005).

2.3.2.5 Vesikel bei Infertilität

Einige Studien befassen sich mit dem Vesikelvorkommen bei infertilen Probanden.

Brody et al. (1981) verglichen beispielsweise das morphologische Erscheinungsbild der vesikulären Strukturen im gesplitteten Ejakulat sowie die vesikuläre Enzymaktivität der Mg^{2+} - und Ca^{2+} -abhängigen ATPase (Ronquist et al. 1978b) eines Patienten mit Azoospermie aufgrund des Klinefeltersyndroms mit den Daten eines gesunden Probanden. Auffällig war ein quantitativer, nicht aber qualitativer Unterschied hinsichtlich der Anzahl der Vesikel, die in der abnormen Probe in sehr viel geringerer Zahl zu finden waren. Dafür konnte hier ein vermehrter Anteil an amorpher Substanz beobachtet werden. Zudem zeigte der infertile Proband im Gegensatz zum gesunden eine deutliche Erniedrigung der vesikelassoziierten Mg^{2+} - und Ca^{2+} -abhängigen ATPase-Aktivität und der Kationenkonzentrationen von Ca^{2+} , Mg^{2+} und Zn^{2+} . In einer anderen Studie zeigten Probanden mit Azoospermie den höchsten vesikulären Proteingehalt (4,25 mg/ml) im Vergleich zu normospermen Proben (2,35 mg/ml) und Proben nach Vasektomie (1,89 mg/ml) (Fabiani und Ronquist 1995b).

Ein Vergleich der Mg^{2+} - und Ca^{2+} -abhängigen ATPase-Aktivität in Seminalplasma von Probanden mit Normospermie und mit Oligozoospermie zeigt eine signifikant niedrigere Aktivität bei Oligozoospermie. Der Grund dafür ist nicht bekannt. Es könnte allerdings eine Testosteronabhängigkeit der Sekretion des ATPase-Systems vorliegen (Stegmayr et al. 1980).

Azoosperme Patienten mit cystischer Fibrose zeigten im Gegensatz dazu keine Erniedrigung der Mg^{2+} - und Ca^{2+} -abhängigen ATPase-Aktivität, wie sie bei oligozoospermen Patienten zu finden war. Auch die sekretorischen Granula und Vesikel zeigten morphologisch und quantitativ keine Abweichungen von der Norm (Stegmayr et al. 1981).

Darüber hinaus werden Antispermien-Antikörper (ASA) im humanen Blutserum im Zusammenhang mit Infertilität gesehen (Vazquez-Levin et al. 2014). Bei Inkubation von vesikelbesetzten Spermien aus Probanden mit ASA-positivem Serum mit polyklonalen, antivesikulären Antikörpern erfolgt eine Agglutination der Keimzellen. Diese geschieht nicht, wenn die Vesikel vorher mit den polyklonalen, antivesikulären Antikörpern präinkubiert werden. Ebenso beobachtet man bei Verbringen von ASA-positivem Serum mit seminalen Vesikeln eine Bindung zwischen den Komponenten. Dies zeigt zum einen eine hohe immunogene Eigenschaft der Vesikel, zum anderen legt es nahe, dass die Vesikel ein Antigen der ASA sind (Allegrucci et al. 2001a; Carlsson et al. 2004b; Carlsson et al. 2004c). Als Hauptantigene wurden neben einigen anderen Proteinen PIP (Prolactin-inducible protein) und Clusterin identifiziert (Carlsson et al. 2004a).

Diese Erkenntnisse führten zur Entwicklung eines Immunoassays auf Basis von seminalen Vesikeln als Alternative zu anderen Testmöglichkeiten (Carlsson et al. 2004b).

2.3.3 Vesikel aus dem Nebenhodenepithel (Epididymosomen)

Epididymosomen, vesikuläre Strukturen eines Durchmessers von 50-250 nm aus der Nebenhodenflüssigkeit, spielen bei verschiedenen Säugern sowie vermutlich auch beim Menschen eine wichtige Rolle im Maturationsprozess der Spermien (Gatti et al. 2004; Sullivan 2008). Ähnlich den Vesikeln aus der Prostata werden sie vom epididymalen Epithel in einem apokrinen Sekretionsmodus sezerniert, sind reich an Sphingomyelin und weisen ein hohes Cholesterol-Phospholipid-Verhältnis auf (Sullivan et al. 2005; 2008). Außerdem überstehen sie physikalische Behandlungen wie Einfrieren, Auftauen, Hypertonie und Ultraschall ohne detektierbare Schädigung ihrer Struktur (Sullivan 2008).

In der Literatur existieren nur sehr wenige Beobachtungen bezüglich der humanen Epididymosomen. Da diese Strukturen aus der Nebenhodenflüssigkeit isoliert werden müssen, sind sie nicht einfach zu gewinnen. Häufig werden deshalb andere Spezies, wie Maus, Ratte oder Bulle, als Forschungsmodelle für den Menschen herangezogen, auch wenn eine interspezifische Übertragung der Ergebnisse natürlich nicht ohne weiteres möglich ist.

Epididymosomen haben, ähnlich den oben beschriebenen Vesikeln prostaticen Ursprungs, ein komplexes Proteinmuster (Thimon et al. 2008). Bei einem Vergleich mit dem Proteom der Vesikel aus der Prostata bestehen Gemeinsamkeiten, wie z.B. das Vorkommen der Proteine MIF (Macrophage migration inhibitory factor) (Frenette et al. 2005) oder Aldose-Reduktase (Frenette et al. 2006), aber auch Unterschiede, die sich unter anderem im Fehlen der Sorbitol-Dehydrogenase in Epididymosmen zeigen (Frenette et al. 2006). Die Proteine CRISP1 (Cysteine-rich secretory protein 1) und HE1/NPC2 (Epididymal secretory glycoprotein 1/Niemann Pick C2 protein) dagegen kommen ausschließlich in den Epididymosomen vor (Thimon et al. 2008). Die Funktion der humanen Epididymosomen ist nicht abschließend geklärt. Aufgrund des Vorkommens verschiedener Proteine sowohl in Assoziation mit den Spermien als auch mit den epididymalen Vesikeln wird eine Interaktion zwischen den Strukturen mit Substanztransfer vermutet, wie sie für die Spezies Rind (siehe 2.6) bereits belegt ist, wo die Vesikel entscheidend zur Spermienreifung beitragen (Thimon et al. 2008). Ein Abgleich des Proteoms der Epididymosomen mit dem Proteom der verschiedenen Nebenhodenabschnitte zeigt, dass in Epididymosomenproben, die aus dem Bereich des distalen Nebenhodens gewonnen werden, Proteine aller epididymalen Abschnitte nachweisbar sind. Daher geht man davon aus, dass diese Proben eine heterogene Mischung aus Partikeln darstellen, die entlang des gesamten Nebenhodens sezerniert werden und aufgrunddessen vermutlich unterschiedlich zusammengesetzt sind (Thimon et al. 2008). Es wird diskutiert, ob das Protein MIF, das als vesikulärer Bestandteil vor allem in Epididymosomen zu finden ist und vornehmlich in Assoziation mit Spermien niedriger Motilität auffällt, über eine Modulation der Zinkionenkonzentration die Beweglichkeit der Spermien im Nebenhoden beeinflusst (Frenette et al. 2005).

2.3.4 Vesikel aus prostaticen Tumorzellen und deren Bedeutung für die Tumordiagnostik
Nicht nur physiologische, prostatiche Drüsenzellen, sondern auch Zellen aus Zelllinien (DU145, PC3 und LNCaP) neoplastisch veränderter Prostatagewebe in vitro (Nilsson et al. 1999b) sezernieren vesikuläre Strukturen. Auch in neoplastisch verändertem Gewebe der Prostata-drüse in vivo (Nilsson et al. 1999a) und in deren vertebrealen Metastasen aus schwach differenzierten Prostatatumoren (Sahlén et al. 2004; Sahlén 2007) finden sich Hinweise auf das Vorkommen von Vesikeln, die sowohl intrazellulär als auch extrazellulär im Interstitium vorkommen. Sahlén et al. (2004) halten daher einen Einsatz der Vesikel als Ziele

für das Immunotargeting in Diagnostik und Therapie von metastasierenden Neoplasien der Prostata für möglich. Darüber hinaus finden sich auch in anderen Körperflüssigkeiten, wie dem Urin (Nilsson et al. 2009; Principe et al. 2013) oder dem Blutplasma (Tavoosidana et al. 2011), exosomale Vesikel aus der Prostata, die zur Tumordiagnostik herangezogen werden könnten.

Ein Unterschied zwischen physiologischen Vesikeln und solchen aus malignen, prostaticen Tumorzellen besteht darüber hinaus in einer niedrigeren ATPase-Aktivität, in einer höheren Expression von Proteinkinasen und damit einer höheren Phosphorylierungskapazität der neoplastischen Vesikel. Tumorrelevante Proteine, wie der Komplementfaktor C3, Fibrinogen, E-Cadherin oder der Gewebefaktor, werden durch Phosphorylierung moduliert, sodass Vesikel durch diese Aktivität das Tumorgeschehen beeinflussen (Babiker 2005; Babiker et al. 2006; Babiker et al. 2007).

Die in ihrer Expression hochregulierten Proteine bzw. die Unterschiede in der Proteinexpression zwischen normalen Prostatasomen und solchen malignen Ursprungs könnten eventuell als Ansatzpunkte für die Etablierung von Prostatatumor-Markerproteinen zur Früherkennung von tumorösen Veränderungen in der Tumordiagnostik bzw. für die Entwicklung von neuen therapeutischen Strategien dienen (Ekdahl et al. 2006).

Die Aminopeptidase N und die Dipeptidyl-Peptidase IV, die als vesikuläre Markerproteine für Partikel aus der Prostata gelten, zeigen in Vesikeln neoplastischen Ursprungs eine geringere Aktivität als in normalen, seminalen Vesikeln (Nilsson et al. 1999b; Bellezza et al. 2005).

Bei Patienten mit Neoplasien der Prostata gelangen - wie oben bereits erwähnt - Vesikel in erhöhtem Ausmaß in den Blutkreislauf. Dies hat die Bildung von antivesikulären Antikörpern zur Folge, die in einer Studie bei 88% der untersuchten Tumorpatienten vorhanden waren (Larsson et al. 2006). Die Hauptantigene dieser Antikörper stellen die Proteine Clusterin und die Hitzeschockproteine 70 und 71 dar. Allerdings befinden sich unter den bisher identifizierten Antigenen weder prostataspezifische noch prostatatumorspezifische Proteine (Ronquist et al. 2006; 2009).

Der Titer der vesikulären Autoantikörper zeigt bei Metastasierung eine signifikante, inverse Beziehung zum Vorkommen von Knochen- und Lymphknotenmetastasen und wird daher als Marker in der Tumordiagnostik diskutiert (Larsson et al. 2006, Nilsson et al 2001, Minelli et al. 2005) so dass die Antikörper-Titer als sinnvolle Ergänzung zur Bestimmung der PSA (Prostata-spezifisches Antigen) angesehen werden (Nilsson et al 2001, Minelli et al. 2005).

Andere Arbeiten sehen den Einsatz der Antikörper kritisch (Sahlen et al. 2007) oder können die vorherigen Ergebnisse nicht bestätigen (Stewart et al. 2009).

Daneben kommen jedoch auch die Vesikel selbst als Tumormarker in Frage. Laut einer Studie von Tavoosidana et al. (2011) liegt die Vesikelkonzentration im Blutplasma von Prostatatumorpatienten mit hohem Gleason Score (≥ 7), d.h. mit Diagnose von schlecht bzw. undifferenzierten Tumoren, mehrfach höher als diejenigen in einer gesunden Kontrollgruppe oder bei niedrigerem Gleason Score (<7) (Diagnose von gut bis mittelgradig differenzierten Tumoren).

Eine weitere nicht-invasive Detektionsmöglichkeit für Prostatatumoren im Zusammenhang mit Vesikeln aus dem Ejakulat ist die Messung von δ -Catenin-Konzentrationen im Urin, welches in Assoziation mit den vesikulären Partikeln vorkommt und bei Prostatatumorpatienten in erhöhten Konzentrationen im Urin zu finden ist (Lu et al. 2009).

2.4 Vesikel in der Sekretionsflüssigkeit des Genitaltrakts der Rammeler (Kaninchen)

2.4.1 Ursprung und Morphologie der Vesikel

Mit einer der ersten Veröffentlichungen überhaupt, die sich mit vesikulären Partikeln im Ejakulat beschäftigte, stammt von Metz et al. (1968). Sie beschrieben erstmals vesikuläre, membranbegrenzte Strukturen im Seminalplasma des Kaninchens, die sie in dichte, vesikuläre und amorphe membranumschlossene Strukturen einteilen. Davis et al. (1973) dagegen unterteilen die im Seminalplasma vorkommenden Vesikel anhand der Dichte (I: $1,2 \text{ g/cm}^3$ bzw. II: $1,16 \text{ g/cm}^3$) und der Sedimentationsgeschwindigkeit (250 S bzw. 85 S) bei der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation. Sie definieren davon ausgehend zwei Vesikeltypen, nämlich schwere (Fraktion I) und leichte Vesikel (Fraktion II). Ultrastrukturell beschreiben sie runde Vesikel, die von einer trilamellären, etwa 8,3 nm dicken Membran umschlossen sind, wobei Fraktion I durchschnittlich größere Vesikel beinhaltet als Fraktion II (durchschnittlicher Durchmesser: 60,7 nm bzw. 50,9 nm). Außerdem werden in beiden Fraktionen Vesikel eines Durchmessers von über 80 nm erwähnt, die etwa 10% der Gesamtmenge ausmachen und vermutlich auf Aggregation der Vesikel zurückzuführen sind. Insgesamt sind diese Vesikel damit erheblich kleiner als diejenigen anderer Spezies. Während Minelli et al. (2003) ähnliche Durchschnittswerte (70 nm) hinsichtlich des Vesikeldurchmessers ermitteln, berichten Castellini et al. (2012) jedoch über deutlich

größere Strukturen, die sie elektronenmikroskopisch in kleine Vesikel (0,5 µm) und große oder Speichervesikel (4 µm) einteilen.

Davis et al. (1973) vermuten den Spermienzerfall als Quelle der Vesikel aus Fraktion I. Hinsichtlich der Fraktion II-Vesikel, die sich ebenfalls bei vasktomierten Tieren finden, nehmen sie einen post-epididymalen, spermienunabhängigen Ursprung an. Aktuelle Beobachtungen von Castellini et al. (2012) unterstützen die Hypothese eines Ursprungs aus den akzessorischen Geschlechtsdrüsen: Die Vesikel entspringen vermutlich der Prostata, vor allem aus der Proprostata (vorderer Abschnitt) und aus der Prostata (mittlerer Abschnitt) des Rammfers. Analog zu der Situation beim Menschen konnten in der Kaninchenprostata exo- und diacytotische Vorgänge zur Vesikelfreisetzung nachgewiesen werden.

Bezüglich der Vesikeldichte im Ejakulat finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben. Sie reichen von $490 \pm 83 \times 10^6$ Vesikel/ml Ejakulat (Mourvaki et al. 2008) bis 10^{14} Vesikel /ml Seminalplasma (Davis 1973) bzw. 1,2 mg Vesikelprotein/ml Sperma (Mourvaki et al. 2010b) und 9,5 µg Vesikel/g Ejakulat (Castellini et al. 2006).

2.4.2 Biochemie der Vesikel

Im Gegensatz zur Spezies Mensch sind beim Kaninchen nur wenige vesikuläre Komponenten eindeutig identifiziert.

2.4.2.1 Proteom der Vesikel

Beide durch Davis et al. (1976) definierten Vesikeltypen besitzen das gleiche Hauptpolypeptid, das ein Molekulargewicht von etwa 95 kDa besitzt. Unterschiede gibt es dagegen im Glykoproteinbesatz der Vesikelloberfläche. Insgesamt macht der Proteinanteil etwa 1/5 des Vesikelnassgewichts aus.

2.4.2.2 Lipidom der Vesikel

Die Lipidzusammensetzung der Vesikel ist in Tab. 2 dargestellt. Auffällig ist, dass die von Davis et al. (1976) eingeteilten leichten Vesikel fast doppelt so viel Lipid enthalten wie die schwereren Vesikel. Mourvaki et al. (2010b), die keine Vesikeleinteilung vornahmen, zeigten, dass mehr als die Hälfte des Sterolgehalts der Vesikel auf Desmosterol (56,7%) entfällt.

Tab. 2: Lipidom der Vesikel im Ejakulat des Rammlers

Vesikuläre Strukturen des Ejakulats				
Quelle	Quelle 1 (Schwere Vesikel)	Quelle 1 (Leichte Vesikel)	Quelle 2	Quelle 3
Lipidsubstanzen				
Ch	139 µg/mg Pr.	260 µg/mg Pr.	46 µg/10 ⁹ Zellen	187 nmol/mg Pr.
Ges.LP	173 µg/mg Pr.	354 µg/mg Pr.	32 µg/10 ⁹ Zellen	-
Ph/Ch	-	-	0,35	-
Phospholipidsubstanzen				
PE	14,6% des Ges.LP	36,6% des Ges.LP	21,3 [*]	-
PC	<2,4% des Ges.LP	12,2% des Ges.LP	36,28 [*]	-
SM	68,3% des Ges.LP	36,6% des Ges.LP	8,2 [*]	-
PS	7,3 % des Ges.LP	7,3 % des Ges.LP	11 [*]	-

Quelle 1= Davis und Hungrund 1976; Quelle 2= Castellini et al. 2006; Quelle 3= Mourvaki et al. 2010b; Ges.LP= Gesamtlipidphosphorgehalt; Ph/Ch = Phospholipid-Cholesterol-Verhältnis; PE= Phosphatidylethanolamin; PC= Phosphatidylcholin; SM = Sphingomyelin; Ch = Cholesterol; PS= Phosphatidylserin; PI= Phosphatidylinositol; * Einheit unklar; Pr. Protein

2.4.3 Interaktion der Vesikel mit Spermien

Vesikel sind auch beim Kaninchen in der Lage, Lipidsubstanzen auf die Spermien zu übertragen (Mourvaki et al. 2010b). Der genaue Mechanismus ist bislang unklar. Jedoch wurden zahlreiche Studien bezüglich des vesikulären Effekts auf die Spermienphysiologie durchgeführt, die im Folgenden dargestellt werden.

2.4.3.1 Vesikulärer Einfluss auf die Spermienmotilität

Zusätzlich wird den Vesikeln eine förderliche Wirkung auf die Spermienmotilität zugeschrieben (Collodel et al. 2012; Castellini et al. 2013), die jedoch nicht auf Sterolgrundlage basiert (Mourvaki et al. 2010b). Der genaue, molekulare Mechanismus des Effekts beim Rammler ist noch nicht erforscht.

2.4.3.2 Vesikulärer Einfluss auf die Kapazitation

Davis et al. (1974) untersuchten die Wirkung der Vesikel beider Fraktionen bei Inkubation mit Spermien. Als Parameter legten sie die Anzahl befruchteter Eizellen weiblicher Kaninchen nach Insemination der behandelten Spermien fest. Aus den Ergebnissen schlossen sie, dass Fraktion I und II sowie native epididymale Flüssigkeit eine befruchtungsdepressive Wirkung zeigen und die Spermienzellen durch eine reversible Dekapazitations-Aktivität beeinflussen. Während Oberflächenproteine der Vesikel für diesen Vorgang als irrelevant angesehen werden, soll der Lipidgehalt Grundlage für die inhibitorische Wirkung sein. Diese Annahme wird durch die Verringerung des inhibitorischen Effekts nach partieller Extraktion von Cholesterol und Phospholipiden aus den Vesikeln in Studien belegt (Davis und Hungrund 1976). Damit lässt sich auch die höhere Dekapazitations-Aktivität der leichten Vesikel erklären, die etwa doppelt so viel Lipid enthalten wie die schwereren (Davis 1974). Mourvaki et al. (2010b) fanden heraus, dass sowohl Desmosterol als auch Cholesterol nach vesikulärem Transfer auf die Spermienzellen zur Stabilisierung der Spermienmembran beitragen und dadurch ab einer Konzentration > 1 mg/l einen inhibitorischen Effekt auf die Spermienkapazitation haben. Auch Collodel et al. (2012) sehen die Vesikel als inhibierende Faktoren der Kapazitation sowie der Akrosomreaktion an.

Die Forschergruppe um Minelli et al. (2003) dagegen postuliert eine fertilitätsfördernde Wirkung der vesikulären Partikel auf unkapazitierte Spermien des Rammfers. Als molekulare Grundlage sehen sie die Fähigkeit der Vesikel, Diadenosin-Polyphosphate (ApnA), wie Ap3A, Ap4A, ATP und ADP, nicht aber AMP (Adenosinmonophosphat), mit Hilfe des vesikelassoziierten Enzyms ecto-ATP-Diphosphosphatase (ecto-Apyrase) enzymatisch abzubauen. Die Zugabe von Vesikeln und Diadenosin-Polyphosphaten zum Kapazitationsmedium soll auf dieser Basis einen ähnlichen kapaziationsfördernden Effekt besitzen wie die Substanz BSA (Bovines Serumalbumin), ohne die spontane Akrosomrate zu erhöhen. Dieser Effekt beruht möglicherweise auf einem Zusammenspiel mit dem Enzym 5'-Nukleotidase der Spermien, durch dessen Aktivität die Substanz Adenosin als Endprodukt entsteht, die wiederum an Adenosinrezeptoren auf der Spermienoberfläche (Minelli et al. 2000) binden und so die Kapazitation positiv beeinflussen kann (Allegrucci et al. 2001b).

2.4.3.3 Vesikulärer Einfluss auf die Akrosomreaktion

Der Einfluss der Vesikel im Ejakulat des Rammlers auf die Akrosomreaktion ist nicht vollständig geklärt. Die Anwesenheit von prostatistischen Vesikeln führt unabhängig von der Vesikelgröße bei Inkubation mit Spermien zu einer Reduktion der Akrosomreaktion. Dieser Effekt erfolgt zumindest teilweise auf Proteinbasis, weil er nach Erhitzen der vesikulären Strukturen ausbleibt (Castellini et al. 2012). Die Vesikel wirken dabei vermutlich im Zusammenspiel mit zahlreichen anderen Sperma-Komponenten (Castellini et al. 2013).

2.4.3.4 Antioxidativer Effekt der Vesikel

In Versuchen zeigte sich zudem eine antioxidative Wirkung, da die Alpha-Tocopherol-Konzentration in der Umgebung von Spermien, die in Anwesenheit von Vesikeln in vitro oxidativem Stress ausgesetzt wurden, höher war als in Kontrollansätzen ohne Vesikelzusatz (Mourvaki et al. 2010a). Weil die vesikulären Partikel reich an Tocopherolen sind (Mourvaki et al. 2008), nimmt man an, dass sie als Vitamin-E-Reservoir für die Keimzellen dienen (Mourvaki et al. 2010a).

2.5 Vesikel in der Sekretionsflüssigkeit des Genitaltrakts des Ebers

2.5.1 Ursprung der Vesikel

Porcine Vesikel finden sich hauptsächlich in der spermienreichen Fraktion des Ejakulats, wohingegen das Vorsekret keine und das Nachsekret nur eine geringe Menge an Vesikeln aufweist (Ghaoui et al. 2004).

2.5.2 Morphologie der Vesikel

Der Vesikeldurchmesser beträgt 40-450 nm (Siciliano et al. 2008) bzw. 18-577 nm (Ghaoui et al. 2004), wobei 95% der Vesikel in einem Größenbereich von 50-180 nm liegen (Piehl et al. 2006). Ghaoui et al. (2004) ermittelten einen durchschnittlichen Vesikeldurchmesser von $130,9 \pm 3,22$ nm. Damit sind porcine Vesikel im Mittel geringfügig kleiner als die entsprechenden humanen Partikel. Elektronenmikroskopisch stellen sich die Vesikel als uni- bis multilamelläre, rundliche Strukturen dar, die zum Teil elektronendichtes, granuläres Material enthalten (Ghaoui et al. 2004; Piehl et al. 2006).

2.5.3 Biochemie der Vesikel

2.5.3.1 Proteom der Vesikel

Hinsichtlich der Proteinzusammensetzung lässt sich mit Hilfe der elektrophoretischen Auftrennung ein komplexes Proteinmuster mit zwei deutlichen Hauptbanden im Bereich von etwa 60 kDa und 90 kDa nachweisen (Siciliano et al. 2008). Daneben konnten Siciliano et al. (2008) weitere Banden im Bereich von 6, 16, 19, 23, 25, 28, 31 und 41 kDa darstellen; eine weitere Charakterisierung erfolgte jedoch nicht. Der Forschergruppe um Piehl (2013) gelang die Identifikation einiger vesikulärer Proteine, darunter Strukturproteine, wie z.B. Aktin, Plastin, Ezrin oder Condensin, Enzyme, wie Aminopeptidase, Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Aldehydreduktase, Triosephosphat-Isomerase, Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase und einige seminalplasmaspezifische Polypeptide, insbesondere die Spermadhesine Porcines Seminalprotein I, AQN und AWN.

2.5.3.2 Lipidom der Vesikel

Die Vesikel des Eberejakulats weisen ähnlich den menschlichen Vesikeln ein hohes molares Cholesterol-Phospholipid-Verhältnis von 1,8 sowie Sphingomyelin als Hauptphospholipid (etwa 40% des Gesamtlipidphosphorsgehalts) auf (Piehl et al. 2006).

Der S-Parameter der Vesikelmembranen, der ein Kriterium zur Beurteilung der Membranfluidität darstellt, beträgt $0,73 \pm 0,02$ für die membranösen Vesikel und $0,644 \pm 0,008$ für die Spermienprobe. Diese Werte stimmen hinsichtlich der unterschiedlichen Zusammensetzung der Vesikel- bzw. der Spermienmembran mit den Ergebnissen der Lipidanalyse überein und geben Grund zu der Annahme, dass eine Funktion der Vesikel in einer Stabilisierung der Spermienmembran bestehen könnte (He et al. 2001; Piehl et al. 2006).

2.5.4 Interaktion der Vesikel mit Spermien

2.5.4.1 Vesikulärer Transfer von Substanzen

Genauso wie humane Vesikel sind porcine Vesikel in der Lage, ihre Komponenten auf Spermien zu übertragen. Dies bestätigen die Studien von Siciliano et al. (2008) und Piehl et al. (2013), die den Transfer des Enzyms Aminopeptidase bzw. von anderen vesikel-eigenen Proteinen von den vesikulären Strukturen auf die Keimzellen belegen.

2.5.4.2 Vesikulärer Einfluss auf die Spermien –Motilität, Kapazitation, Akrosomenreaktion, Bindungsfähigkeit an die Zona pellucida

Während Piehl et al (2013) keine Wirkung der Vesikel auf die Spermienmotilität nachweisen konnten, konnten die Autoren jedoch zeigen, dass die Anwesenheit der Vesikel einen Einfluss auf die Spermienkapazitation hat. So zum Beispiel ist bei Spermien in vesikelhaltigem Kapazitationsmedium im Vergleich zu vesikelfreien Kontrollansätzen eine Reduktion des Cholesterolverlustes nachweisbar, was einen Anstieg der Membranfluidität, ein charakteristisches Merkmal der Kapazitation (Cross 1998; Cross 2003), verhindert. Die Tyrosinphosphorylierung von Spermienproteinen im hochmolekularen Bereich, die bei verschiedenen Spezies ebenfalls im Rahmen der Kapazitation erfolgt (Visconti et al. 1995; Tardif 2001; Pommer et al. 2003; Grasa et al. 2006), ist von der vesikulären Anwesenheit weitgehend unbeeinträchtigt. Auffällig ist jedoch, dass die Phosphorylierung eines 14 kDa-Proteins in vesikelhaltigen Ansätzen abhängig von der vesikulären Konzentration unterbleibt. Dieser Effekt auf das niedermolekulare Protein, das bisher nicht näher identifiziert wurde, geschieht vermutlich auf Lipidbasis (Piehl et al. 2013).

Die Ergebnisse bezüglich der porcinen vesikulären Effekte auf die Akrosomreaktion sind kontrovers (Siciliano et al. 2008): Während Siciliano et al. (2008) in vitro einen signifikant höheren Anteil an Akrosom-reagierten Spermien in der vesikelhaltigen Versuchsgruppe im Vergleich zu einer vesikelfreien Kontrollgruppe fanden und dies als eine Induktion der Akrosomreaktion infolge eines Transfers verschiedener vesikulärer Substanzen auf die Spermien werteten, konnten Piehl et al. (2013) weder einen Einfluss der Vesikel auf die spontane noch auf die Lysophosphatidylcholin-induzierte Akrosomreaktion verifizieren. Allerdings reduzierten Vesikel in vitro das Bindungsvermögen der Gameten an die Zona pellucida (Piehl et al. 2013).

2.6 Vesikel in der Sekretionsflüssigkeit des Genitaltrakts des Bullen

2.6.1 Ursprung der Vesikel

Beim Bullen sind zwei Vesikelpopulationen beschrieben, die nach ihrem Ursprung benannt sind: Vesikulosomen, partikuläre, membranöse Strukturen aus der Samenblase (Agrawal 1987) und Epididymosomen, Vesikel aus dem Nebenhoden (Frenette und Sullivan 2001). Hinweise auf Vesikel aus der bovinen Prostata gibt es nicht. Bei der Untersuchung von Drüsengewebe aus Prostata und Samenblase des Bullen mittels Kaninchen-Antikörpern

gegen eine humane Prostatasomenprobe zeigten sich nur in der Samenblase im Bereich des apikalen Zytoplasmas sowie im Drüsenlumen positive Reaktionen, die denen im humanen Prostatagewebe sehr ähnlich waren (Renneberg et al. 1997). Welchen Anteil die jeweiligen Vesikelpopulationen im Seminalplasma ausmachen bzw. ob Epididymosomen überhaupt in relevantem Ausmaß im Ejakulat vorhanden sind, ist unklar.

2.6.2 Vesikulosomen

2.6.2.1 Morphologie der Vesikulosomen

Im Sekret der bovinen Samenblase und im Lumen dieser Geschlechtsdrüse sind tri- bis multilamelläre, membranumschlossene Partikel zu finden. Agrawal et al. (1987) teilen diese hinsichtlich der Größe in zwei Gruppen ein, kleinere Vesikel umgeben von einer trilamellären Einheitsmembran, die granuläres Material in unterschiedlichen Anteilen enthalten, und größere Vesikel, sogenannte Speichervesikel, die kleinere Vesikel des ersten Typs enthalten.

2.6.2.2 Proteom der Vesikulosomen

Vesikel aus dem bovinen Seminalplasma, die vermutlich auch die Vesikulosomen umfassen, zeigen ein komplexes Proteinspektrum im Bereich von 10-150 kDa. Im Unterschied zu vesikulären Proteinmustern anderer Spezies, wie Hund oder Mensch, zeigt sich beim Bullen nach elektrophoretischer Auftrennung eine deutliche Bande bei etwa 14 kDa. Außerdem konnten in Übereinstimmung mit anderen Spezies zahlreiche Enzyme der Glykolyse sowie ATPasen nachgewiesen werden, die den Vesikeln eine eigene ATP-Bildung ermöglichen (Ronquist et al. 2013b).

In ausdrücklicher Assoziation mit Vesikulosomen werden in der Literatur verschiedene Enzyme, wie z.B. Mg^{2+}/Ca^{2+} -abhängige, ouabain-resistente ATPase, die basale ATPase (EC 3.6.1.3), Aminopeptidase A (EC 3.4.11.7), Alanylaminopeptidase (EC 3.4.11.2), γ -Glutamyltranspeptidase (EC 2.3.2.2) oder Dipeptidylpeptidase IV (EC 3.4.14.5), genannt. Dagegen fehlt im Unterschied zu humanen Prostatasomen eine Aktivität von Angiotensin-Converting-Enzym (3.4.15.1) und eine Endopeptidase (EC 3.4.21) in der partikulären Probe (Agrawal 1987).

2.6.2.3 Interaktion der Vesikulosomen mit den Spermien

Vesikulosomen induzieren bei Inkubation mit epididymalen Spermien sowohl ein hyperaktives Motilitätsmuster als auch deren Akrosomreaktion.

Zudem weisen Vesikel aus dem Seminalplasma immunmodulierende Eigenschaften auf. So ist nicht nur eine Inhibition von mitogeninduzierter Proliferation von Lymphozyten, sondern auch eine Inhibition der Phagozytose-Aktivität von neutrophilen Granulozyten *in vitro* beschrieben. Darüber hinaus zeigt sich in Anwesenheit der Vesikel auch eine Reduktion der neutrophilen Superoxidproduktion (Lazarevic et al. 1995).

Außerdem ist eine Induktion des Verlusts des spermiden Proteins ABCG2 (ATP-binding cassette membrane transporter G2), einem Membrantransporter, der den Efflux von Sulfatkonjugaten (Suzuki et al. 2003) und Sterolen (Janvilisri et al. 2003) unterstützt und in den Spermien während des Durchgangs durch den Nebenhoden aktiv, im Ejakulat jedoch inaktiv ist, durch die Vesikel beschrieben (Caballero et al. 2012).

2.6.3 Epididymosomen

2.6.3.1 Klassifizierung und Morphologie der Epididymosomen

Die bovinen Epididymosomen stellen sich ultrastrukturell bezogen auf Größe und Elektronendichte sehr heterogen dar. Dies äußert sich in der Literatur durch zum Teil kontroverse Angaben verschiedener Forschergruppen hinsichtlich morphologischer Kriterien. Schwarz et al. (2013) nehmen aufgrund der unterschiedlichen Morphologie der apokrin sezernierten Epididymosomen aus Nebenhodenkopf und –schwanz die Existenz von zwei Populationen an, die sich im epididymalen Lumen nicht vermischen. Während Vesikel aus dem Nebenhodenkopfbereich einen Durchmesser von etwa 90-450 nm aufweisen, findet man im Nebenhodenschwanzbereich größere Partikel, die einen Durchmesser von 150-750 nm haben und deren Inhalt eine geringere Elektronendichte aufweist. Beide Populationen sind frei von Organellen. Caballero et al. (2013) dagegen beschreiben Vesikel einer Größe von 20-1000 nm im Nebenhodenkopfbereich und solche einer Größe von 25-300 nm im kaudalen Abschnitt des Nebenhodens.

Girouard et al. (2011) sehen die Vesikelgesamtheit aus Nebenhodenkopf und –schwanz ebenfalls als heterogen, bestehend aus sphärischen, unregelmäßig geformten Gebilden, die eine glatte Oberfläche und einen Durchmesser von 25-300 nm aufweisen. Sie unterteilen zusätzlich die Vesikel des Nebenhodenschwanzes in zwei Gruppen, die sich in Dichte und

biochemischer Zusammensetzung unterscheiden. Vesikel mit geringer Elektronen- und Schwimmdichte (1,02-1,15) haben einen hohen Lipidanteil, genauer vor allem einen hohen Cholesterol-, Sphingomyelin- und Gangliosid M1-Anteil, während Vesikel mit höherer Elektronen- und Schwimmdichte ($\geq 1,15$) sich durch einen hohen Proteinanteil auszeichnen (Frenette et al. 2010).

Eine weitere Subpopulation der Epididymosomen aus dem Nebenhodenschwanz ist durch die Komponente Tetraspanin CD9, einem exosomalen Marker (Mathivanan et al. 2010), gekennzeichnet. Es handelt sich um Mikrovesikel (30- 120 nm), die sowohl Proteine als auch Lipide auf lebende Spermien übertragen können (Caballero et al. 2013).

2.6.3.2 Biochemische Zusammensetzung der Epididymosomen

Die Protein- und Lipidzusammensetzung der Epididymosomen aus verschiedenen Populationen ist unterschiedlich.

2.6.3.2.1 Proteom der Epididymosomen

Das Proteinmuster der Epididymosomen aus dem Nebenhodenkopf unterscheidet sich deutlich von demjenigen der epididymalen Flüssigkeit und von demjenigen der Vesikel aus dem Ejakulat (Frenette et al. 2003). Hinsichtlich der Proteinzusammensetzung bestehen Gemeinsamkeiten zwischen den Vesikeln aus Nebenhodenkopf und -schwanz in 231 identifizierten Proteinen. Hierzu gehören Rab- und SNARE-Proteine (Girouard et al. 2011), die vornehmlich bei Fusionvorgängen eine Rolle spielen (Malsam et al. 2008). Unterschiede finden sich allerdings in vergleichbarer Zahl, was vor allem Enzyme und Transportmoleküle sowie glycan-modifizierte Enzyme betrifft (Girouard et al. 2011). Einige der identifizierten vesikelassoziierten Proteine stehen im Zusammenhang mit fertilitäts-relevanten Vorgängen, wie z.B. der Modifikation der Spermienoberfläche, der Spermienmotilität oder der Interaktion zwischen Spermien- und Eizelle, was vesikuläre Funktionen bei diesen Prozessen wahrscheinlich macht (Girouard et al. 2011). Ausführliche Ergebnisse der Proteomanalysen finden sich in der entsprechenden Literatur (Frenette et al. 2003; Girouard 2009; Frenette et al. 2010; Girouard et al. 2011).

2.6.3.2.2 Lipidom der Epididymosomen

Epididymosomen aus dem Nebenhodenkopf haben verglichen mit Vesikeln aus dem Nebenhodenschwanz einen genauso hohen (Girouard et al. 2011) bis höheren Cholesterolgehalt (Verhältnis Caput-Vesikel vs. Cauda-Vesikel 1,3) (Schwarz et al. 2013). Auch der Phospholipidgehalt der Caput-Vesikel ist höher, wobei Sphingomyelin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin in beiden Gruppen den Hauptanteil ausmachen (Girouard et al. 2011; Schwarz et al. 2013).

2.6.3.3 Interaktion der Epididymosomen mit der Umgebung

2.6.3.3.1 Fusion der Epididymosomen mit den Spermien

Vor allem Spermien aus dem Nebenhodenkopf, in geringerem Ausmaß aber auch solche aus dem Nebenhodenschwanz, interagieren in vitro mit Epididymosomen im Rahmen einer Fusion der Strukturen. Diese Fusion erfolgt zeit- und pH-abhängig, wobei sie in neutralem und alkalischem Niveau (pH 7-8) nicht stattfindet. Bei pH 5- 6,5 herrschen dagegen optimale Bedingungen (Schwarz et al. 2013).

2.6.3.3.2 Transfer von epididysomalen Komponenten auf andere Zellen

Die Inkubation von biotinylierten Vesikeln (Frenette et al. 2002) bzw. R18-gefärbten, epididymalen Vesikeln (Schwarz et al. 2013) mit Spermien belegt den Transfer von Vesikelkomponenten auf die Spermien in vitro. Transferierte Substanzen finden sich vor allem im Bereich der Akrosomkappe (Frenette et al. 2002) bzw. im Bereich von Kopf-, Hals- und Mittelstückregion der Keimzellen (Schwarz et al. 2013) wieder.

Viele vesikuläre Proteine sowie Lipidsubstanzen werden im Zusammenhang mit einer möglichen Übertragung auf Spermien erwähnt. Belegt sind zum Beispiel der Transfer eines fertilitätsrelevanten Enzyms, der Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase, oder auch die Veränderung der Lipidzusammensetzung der Plasmamembran der Spermien nach Inkubation mit den Vesikeln (Schwarz et al. 2013).

Daher geht man unter anderem von einer Vermittlerfunktion der vesikulären Partikel zwischen dem epididymalen Epithel und den Spermien in Form eines Transports von Substanzen aus und schreibt den Epididymosomen eine entscheidende Rolle bei der Maturation der Spermien zu. Der Transfer von Substanzen ist zeit-, temperatur- und pH-

abhängig (Optimalwerte: 32-37 °C und pH 6-6,5). Zusätzlich wird die Anwesenheit von Zn^{2+} -Kationen als förderlich beschrieben (Frenette et al. 2002).

Der Transfer von CD9-haltigen Mikrovesikeln (siehe 2.6.3.1), die unter anderem Proteine, wie P25b, GliPr1L1 (Glioma *pathogenesis*-related 1-like protein 1) und MIF, enthalten, die für die Reifung der Spermien wichtig sind, läuft unabhängig von der Zn^{2+} -Ionenkonzentration ab. Übertragene Vesikelkomponenten findet man vor allem im Bereich der Akrosomregion sowie des Mittelstücks lebender Spermien. Beteiligt an diesem Transfer ist nicht nur Tetraspanin-CD9, sondern auch CD26 (Caballero et al. 2013).

Hinweise darauf, dass der Transfer im Allgemeinen gerichtet und selektiv stattfindet, finden sich in Untersuchungen von Girouard et al. (2009), die den Transfer des Proteins P25b näher untersuchten. P25b, ein Markerprotein der epididymalen Spermienreifung, das mit den Vesikeln über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker im Bereich von DRM (detergent-resistant-membrane)-Domänen auf der Membranoberfläche assoziiert ist, wird von diesen Partikeln auf die Spermienoberfläche übertragen und in deren DRM-Domänen integriert (Frenette und Sullivan 2001).

Interessant ist der Transfer des Proteins ELSPBP1 (Epididymal sperm binding protein 1) von Epididymosomen auf Spermien. Dieses Protein scheint vorzeitig, also vor der Ejakulation, abgestorbene Spermien zu markieren. In Studien waren dementsprechend nur diejenigen Spermien empfänglich für den Transfer, die schon vor der Inkubation tot waren (D'Amours et al. 2012).

Neben der epididysomalen Überträgerfunktion zwischen Nebenhodenepithel und Spermien wird auch eine vesikuläre Rolle in der interzellulären Kommunikation zwischen Nebenhodenepithelzellen verschiedener epididymaler Abschnitte über microRNA, die in bovinen Epididymosomen enthalten ist, diskutiert (Belleannee et al. 2013a).

2.7 Vesikel in der Sekretionsflüssigkeit des Genitaltrakts des Schafbocks

2.7.1 Morphologie und Ursprung der Vesikel

Im elektronenmikroskopischen Bild lassen sich Vesikel aus dem Ejakulat des Schafbocks als runde oder sphärisch geformte Strukturen darstellen, die von einer uni- bis multilamellären Membran begrenzt werden. Zum Teil ist kein Inhalt vorhanden, zum Teil zeigt sich im Innern der Vesikel granuläres, elektronendichtes Material. Der Durchmesser der Bläschen beträgt durchschnittlich $159,7 \pm 2,92$ nm, wobei die Spannweite des Durchmessers von 22 nm bis

986 nm reicht. Der genaue Ursprung ist ungeklärt (Ghaoui et al. 2004). Gatti et al. (2005), die eine homogene Gruppe von bilamellären Vesikeln (Durchmesser 64 ± 22 nm bei einer Membrandicke von $7,9 \pm 1,4$ nm) aus der Nebenhodenschwanzflüssigkeit isolierten, gehen davon aus, dass der Hauptanteil der vesikulären Partikel dem Nebenhodenschwanz entstammt und nur geringste Beiträge von den übrigen Geschlechtsdrüsen kommen. Während die Forscher um Gatti (2005) einen Ursprung aus Spermien oder deren Zytoplasmaresten eher ausschließen, sehen Ghaoui et al. (2006) die Möglichkeit, dass Zytoplasmareste der Spermien neben dem Nebenhoden eine Quelle für die Vesikelbildung darstellen. Vor allem die Beobachtungen, dass das Genitalsekret von Tieren nach Vasektomie -im Gegensatz zu anderen Spezies- keine Vesikel mehr enthält und dass ein ultrastruktureller Vergleich zwischen vesikulären Strukturen aus dem Ejakulat und Zytoplasmaresten der Spermienzellen morphologische Gemeinsamkeiten aufweist, bekräftigen ihrer Ansicht nach die Annahme, dass Hoden oder Nebenhoden als einzige Orte der Vesikelentstehung in Frage kommen.

2.7.2 Biochemie der Vesikel

2.7.2.1 Proteom der Vesikel

Das Proteom der Vesikel zeigt nach eindimensionaler, elektrophoretischer Auftrennung deutliche Banden bei 45, 110 und 140 kDa. Darüber hinaus weist das Proteom der Vesikel des Schafbockes Gemeinsamkeiten zu anderen Spezies auf. Identifiziert wurden zum Beispiel membrangebundene Enzyme, wie Dipeptidyl-Peptidase IV, Neprilysin, Phosphodiesterase-I und Protein G- β , außerdem vesikelassoziierte Proteine, wie Lactadherin und vakuoläre ATPase, zytoskeletale Proteine, wie Actin, Ezrin, Annexin, und einige metabolische Enzyme sowie das zelluläre Prionprotein Prp^C. Ausführliche Auflistungen sind der entsprechenden Literatur zu entnehmen (Gatti et al. 2005; Ecroyd et al. 2004).

2.7.3 Interaktion der Vesikel mit Spermien

2.7.3.1 Vesikulärer Transfer und Fusion

Während ein Transfer von Substanzen von Vesikeln auf Keimzellen als möglich betrachtet wird, halten Gatti et al. (2005) eine Fusion zwischen den Strukturen aufgrund des Fehlens von vesikeltypischen Proteinen im Proteom von Spermien aus dem Nebenhodenschwanz oder dem Ejakulat eher für unwahrscheinlich.

2.7.3.2 Vesikulärer Einfluss auf die Spermienmotilität

Obwohl den vesikulären Strukturen im Seminalplasma bei anderen Spezies in vielen Veröffentlichungen eine motilitätsfördernde Wirkung zugeordnet wird, gehen Ghaoui et al. (2007) nicht von einer förderlichen Wirkung der Vesikelfraktion aus, sondern schreiben diese anderen Komponenten des Seminalplasmas zu.

2.8 Vesikel in der Sekretionsflüssigkeit des Genitaltrakts des Hengstes

2.8.1 Morphologie der Vesikel

Equines Seminalplasma enthält rundliche Vesikel, die im Mittel einen Durchmesser von 100 nm (Spannweite 75-175 nm) (Minelli et al. 1998), 160-180 nm (Arienti et al. 1998a) bzw. 164.1 ± 4.42 nm (Spannweite 15-671 nm) (Ghaoui et al. 2004) aufweisen und vermutlich aus einer einheitlichen Population bestehen (Arienti et al. 1998a). Die vesikulären Strukturen finden sich ebenso wie beim Eber insbesondere in der spermienreichen Fraktion des Ejakulats (Ghaoui et al. 2004). Bei der transelektronenmikroskopischen Untersuchung stellt sich wie bei allen Spezies eine uni- bis multilamelläre Einheitsmembran der runden Vesikel dar, die elektronendichtes, weitgehend unorganisiertes, granuläres Material enthalten oder keinen Inhalt aufweisen (Arienti et al. 1998a; Minelli et al. 1998; Ghaoui et al. 2004). Einfrier- und Auftauvorgänge überstehen diese Strukturen intakt (Ghaoui et al. 2004).

2.8.2 Biochemie der Vesikel

2.8.2.1 Proteom der Vesikel

Im equinen Ejakulat ist der Vesikelproteingehalt bezogen auf den Spermienproteingehalt um einiges niedriger als beim Menschen (Vesikel-Protein/Sperma-Protein-Verhältnis von $0,7 \pm 0,2$ beim Hengst (Arienti et al. 1998a) bzw. Spermien-Protein/Vesikel-Protein-Verhältnis von $0,6 \pm 0,1$ beim Menschen (Carlini et al. 1997)). Das Proteinmuster der vesikulären Partikel des Hengstes ist, genauso wie das der anderen Spezies, komplex. Es finden sich sowohl Proteine im niedrigmolekularen Bereich als auch im sehr hochmolekularen Bereich (von < 6 kDa bis >200 kDa) (Ronquist et al. 2013b). In Assoziation mit den Vesikeln sind verschiedene Enzymaktivitäten nachweisbar, die sich auch in den vesikulären Strukturen des Menschen finden, so z.B. Aktivitäten von Dipeptidylpeptidase IV (CD26, EC 3.4.14.5), Endopeptidase (EC 3.4.2.1) sowie der 5'-Nukleotidase (EC 3.1.3.5) (Minelli et al. 1998). Ronquist et al. (2013b;

2013a) konnten die Liste der vesikelassoziierten Enzyme um eine Reihe weiterer Proteine ergänzen. Eine detaillierte Auflistung der Proteine, die viele Gemeinsamkeiten hinsichtlich der humanen Partikel enthält, ist der entsprechenden Literatur zu entnehmen. Unter den identifizierten Enzymen finden sich auch glykolyse-spezifische Proteine und verschiedene ATPasen. Dies erklärt die Forschungsergebnisse der Studien von Minelli et al. (1998), die sowohl Adenosin als auch ADP und ATP in Assoziation mit den Vesikeln vorfanden.

2.8.2.2 Lipidom der Vesikel

Das Cholesterol-Phospholipid-Verhältnis ist mit 1,7 ähnlich den Ergebnissen aus dem humanen Bereich (Arienti et al. 1997c) sehr hoch. Bezüglich der Phospholipide dominiert auch beim Hengst das Sphingomyelin mit einem Anteil von 38% am Gesamtlipidphosphorgehalt, gefolgt von Phosphatidylethanolamin (32%). Dagegen zeigen die Vesikel einen vergleichsweise niedrigen Gehalt an Phosphatidylcholin (13%) (Arienti et al. 1998a).

2.8.3 Interaktion der Vesikel mit den Spermien

2.8.3.1 Vesikulärer Transfer und Fusion

Equine Spermien, bei denen normalerweise keine Endopeptidase-Aktivität messbar ist, zeigen eine deutliche Zunahme dieser Enzymaktivität nach Zugabe von Vesikeln bis 60 Minuten nach der Inkubation, was auch bei dieser Spezies eine enge, vesikuläre Interaktion mit den Spermienzellen vermuten lässt (Minelli et al. 1998). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von einem zeitabhängigen, fusions-ähnlichen Prozess zwischen Spermien und Vesikeln, der über eine zunächst brückenartige Verbindung zwischen den Membranen zur Vermischung der Membrankomponenten führte, belegen diese Annahme (Minelli et al. 1998). Der beschriebene Prozess erfolgt im Unterschied zu der Fusion zwischen humanen Spermien und menschlichen Prostatasomen nicht bei einem pH von 4-5 (Arienti et al. 1997a), sondern bei einem pH von 7,5 (Minelli et al. 1998). Detaillierte Untersuchungen des Fusionsmechanismus zeigen, dass die Substanzen CD26 (Dipeptidyl-Peptidase IV) und ecto-Adenosin-Deaminase (ecto-ADA), die sich beide auf der equinen Vesikeloberfläche befinden, dabei eine Rolle spielen. Auf der Spermienoberfläche können im äquatorialen Segment des Spermienkopfes CD26, ecto-ADA und A₁-Adenosin-Rezeptoren nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass die Fusion zwischen Spermien und Vesikeln über einen Komplex aus

ecto-ADA und CD26 (Kameoka et al. 1993) unter Beteiligung des Adenosinrezeptors, der ebenfalls eine Bindungsstelle für ecto-ADA besitzt (Ciruela et al. 1996; Minelli et al. 2000), zustande kommt (Minelli et al. 1999). Diese Beobachtungen werden durch die Studien von Aalberts et al. (2013) untermauert, die nach Inkubation von Spermien und Vesikeln aus dem Ejakulat des Hengstes eine Bindung der Vesikel im Bereich des Spermienkopfes nachweisen konnten. Interessanterweise trat diese vornehmlich nach Einsetzen der Kapazitation im alkalischen Milieu ($\text{pH} \geq 7,5$) ein. Dies veranlasste die Forscher zu der Annahme, dass die Anheftung der Vesikel an die Spermien im Uterus stattfindet und sich eine vollständige Fusion erst während dem letztendlichen Erreichen der Eizelle vollzieht.

2.8.3.2 Vesikulärer Einfluss auf die Spermienmotilität

Die vesikulären Partikel aus dem Hengstejakulat haben vermutlich eine positive Wirkung auf die Spermienmotilität (Minelli et al. 1998). Als Grundlage dafür wird unter anderem die Fähigkeit der Vesikel zur ATP-Bildung diskutiert (Ronquist et al. 2013b).

Bei einer Untersuchung der Spermienmotilität und deren Membranintegrität nach der Kryokonservierung, fiel auf, dass Spermienproben von Hengsten, die nach dem Auftauen normalerweise eine niedrige Spermienmotilität ($< 20\%$) aufwiesen, nach Einfrieren mit Seminalplasma von Hengsten höherer, spermider Einfriertauglichkeit ($> 30\%$ progressive Spermienmotilität nach Einfrieren und nachfolgendem Auftauen) eine höhere Rate progressiv beweglicher Spermien zeigten, als wenn die Proben mit eigenem Seminalplasma tiefgefroren wurden. Eventuell liegen diese Ergebnisse in individuell unterschiedlichen Vesikelkonzentrationen im Seminalplasma begründet (Aurich et al. 1996).

2.9 Vesikel in der Sekretionsflüssigkeit des Genitaltrakts des Rüden

2.9.1 Ursprung der Vesikel

Über vesikuläre Strukturen im caninen Ejakulat ist noch relativ wenig bekannt. Ein erster Bericht von Frenette et al. (1985) beschreibt die Existenz von „sekretorischen Granula“ aus dem Prostatahomogenat des Rüden, die eine Argininesterase-Aktivität aufweisen, die der im Seminalplasma ähnlich ist. Es besteht die Möglichkeit, dass diese prostatistischen Granula in das Seminalplasma sezerniert werden, da sie morphologisch den Strukturen aus dem Seminalplasma, die in dieser Arbeit beschrieben werden, ähneln. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Frenette et al. 1986) lassen jedoch aufgrund der

schlechten Qualität keine definitive Aussage zu und der Ursprung der vesikulären Strukturen ist bis jetzt ungeklärt.

2.9.2 Morphologie der Vesikel

Nach Beginn dieser Arbeit veröffentlichten Zelli et al. 2013 erstmals Daten zu Vesikeln, die aus dem caninen Seminalplasma isoliert worden waren.

Nach Zelli et al. (2013) finden sich im Ejakulat des Rüden sphärische Vesikel unterschiedlicher Größen mit uni- bis multilamellären membranösen Begrenzungen. Der mittlere Vesikeldurchmesser beträgt $117,6 \pm 86,9$ nm (Spannweite: 24,4-716,6 nm). Es gibt zum einen kleinere Vesikel (24,4-200 nm), die von einer ein- bis zweifachen Membran umgeben sind, und zum anderen größere, vesikuläre Strukturen (200-716,6 nm), die hauptsächlich durch multilamelläre Membranen begrenzt werden. Da zum Teil auch kleinere Vesikel innerhalb größerer vorkommen, wird eine Speicherfunktion ähnlich der Situation beim Menschen vermutet. Hinsichtlich des Inhalts gibt es vesikuläre Strukturen, die fast vollständig von elektronendichten Material ausgefüllt sind (dunkle Vesikel), und solche, deren Inhalt sich weniger dicht darstellt (helle Vesikel).

2.9.3 Biochemie der Vesikel

2.9.3.1 Proteom der Vesikel

Im Unterschied zum Menschen konnte keine enzymatische Aktivität der Aminopeptidase (EC 3.4.11) in Assoziation mit den Vesikeln nachgewiesen werden, wohl aber enzymatische Aktivitäten der Adenosin-Deaminase (EC 3.5.4.4), der 5'-Nukleotidase (EC 3.1.3.5), der ADPase (EC 3.6.1.5), ATPase (EC 3.6.3.1), Dipeptidylpeptidase IV (EC 3.4.14.5) sowie der alkalischen (EC 3.1.3.1) und der sauren Phosphatasen (EC 3.1.3.2) (Zelli et al. 2013). Diese Liste wurde durch die Identifikation zahlreicher anderer Proteine ergänzt. Unter anderem gehören dazu glykolyse-assoziierte Proteine, die die vesikuläre Fähigkeit zur ATP-Bildung belegen (Ronquist et al. 2013b).

3 Material und Methoden

3.1 Probanden

Insgesamt kamen 35 klinisch gesunde Rüden 21 unterschiedlicher Rassen einmalig bis wiederholt für die Probengewinnung zum Einsatz. Die Hunde waren im Mittel $4,2 \pm 2,2$ Jahre alt (Spannweite: 1,25-11 Jahre) und wogen $32,18 \pm 16,10$ kg (Spannweite: 8,5-80 kg). 33 Hunde kamen dabei aus Privathaushalten, während es sich bei 2 Rüden (Rüde 1 und 2) um klinikeigene Tiere handelte. Die Samenentnahmen erfolgten im Rahmen der andrologischen Untersuchung der Rüden oder im Rahmen der studentischen Ausbildung. Die Samenprobenentnahme fand stets in den Räumlichkeiten der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen statt. Die gewonnenen Proben wurden sowohl für die Etablierung der Methodik als auch für die eigentlichen Untersuchungen genutzt. Da der Ertrag an reinen Vesikelpuben aus dem einzelnen Ejakulat sehr gering war, musste bei Rüden, die nur einmalig für eine Probengewinnung zur Verfügung standen, auf verschiedene Untersuchungen bezüglich der vesikulären Eigenschaften verzichtet werden. Im Anhang findet sich eine detaillierte Übersicht der Probanden mit Rasse, Alter, Gewicht und den jeweils durchgeführten Untersuchungen.

Die Daten aller für die Methodik verwendeten Materialien und Geräte sowie Rezepturen für einzelne Lösungen, die im Folgenden erwähnt werden, sind im Anhang aufgeführt.

3.2 Spermagewinnung

Die Samengewinnung erfolgte bei allen caninen Probanden aus Privatbesitz in Anwesenheit von klinikeigenen Beagle-Hündinnen. Falls letztere sich nicht in der Läufigkeit befanden, wurde ein synthetisches Pheromon (Methyl-4-hydroxybenzoat in alkoholischer Lösung, Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze) im Bereich der Schwanzwurzel kurz vor der Probengewinnung aufgetragen, um die Attraktivität der Hündinnen für die Rüden zu erhöhen. Bei Rüden aus dem Besitz der Klinik konnte meist auf die Anwesenheit von Hündinnen verzichtet werden.

Die Samengewinnung geschah durch manuelle Stimulation des Penis im Bereich des Bulbus glandis, der bis zum „Aufknoten“ (partielle Erektion) massiert wurde. Anschließend wurde die Ejakulation durch ringförmiges Umfassen des hinteren Bulbusanteils mit der Hand

mittels fortwährender, pulsierender Bewegungen weiter unterstützt. Bei Bedarf wurde das „Umsteigen“ über eine Positionsveränderung der Penisspitze in kaudaler Richtung simuliert (Kutzler 2005; Hoffmann 2003; Pesch et al. 2007).

Während der Ejakulation wurden alle drei Fraktionen - Vorsekret, spermienreiche Hauptfraktion und Prostatasekret - in separaten, auf 37° C vorgewärmten Glasgefäßen (Tulpenglas, Minitüb GmbH, Tiefenbach) aufgefangen (Kutzler 2005; Linde-Forsberg 1991, Pesch et al. 2007), um sie direkt im Anschluss getrennt untersuchen und weiter aufarbeiten zu können.

3.3 Spermatologische Untersuchung

Jedes canine Ejakulat wurde direkt nach der Entnahme spermatologisch untersucht. Dafür wurden Aliquots der Samenprobe sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch beurteilt (Vorgehensweise nach Hoffmann 2003), während das restliche Probenmaterial bei 37°C auf einem Heiztisch (Typ H T 200, Minitüb GmbH, Tiefenbach) warm gehalten wurde. Die makroskopische Untersuchung umfasste die Beurteilung aller Fraktionen im Hinblick auf Volumen, Farbe, Geruch und Konsistenz.

Zur mikroskopischen Routine-Analyse der spermienreichen Fraktion (2. Fraktion) gehörten sowohl eine lichtmikroskopische Schätzung der Vorwärtsbeweglichkeit im positiven Phasenkontrast als auch eine Schätzung des Anteils lebender Spermien im Ejakulat und eine Beurteilung der Pathomorphologie am Eosin-gefärbten Ausstrich sowie eine Dichtebestimmung. Außerdem wurden alle drei Fraktionen lichtmikroskopisch betrachtet und hinsichtlich ihrer zellulären Zusammensetzung beurteilt.

Fotografische, lichtmikroskopische Aufnahmen der einzelnen Fraktionen erfolgten mit Hilfe des Mikroskops Leica Leitz DMRB (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) und der Kamera Leica DC 300 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar). Zur Bildbearbeitung und Messung der Vesikeldurchmesser diente das Programm Leica IM 1000 (Version 1.20 Release 19, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar).

Im Rahmen des Tiefgefrierversuches wurden zusätzlich Motilitätsparameter mittels CASA (Computer-assisted sperm analysis mittels SpermVision™-System, Minitüb GmbH, Tiefenbach) erhoben und ein hypoosmotischer Schwelltest durchgeführt. Außerdem erfolgte die Auswertung der Pathomorphologie an einem Spermac®-gefärbten Ausstrich, um etwaige Kopfkappenveränderungen detektieren zu können.

Im Folgenden werden die Methoden der spermatologischen Routineuntersuchung, wie sie für alle gewonnenen Proben Anwendung fanden, näher beschrieben. Verfahren, die dagegen nur im Rahmen des Tiefgefrierversuches genutzt wurden, sind im entsprechenden Abschnitt detailliert erklärt.

3.3.1 Progressive Spermienmotilität

Die Schätzung der Vorwärtsbeweglichkeit erfolgte mittels Lichtmikroskopie in positivem Phasenkontrast (Mikroskop Hund H 500, Objektiv 40x/0,65, Helmut Hund GmbH, Wetzlar). Etwa 10 µl der Probe wurden hierfür auf einen vorgewärmten Objektträger (37 °C) pipettiert (Pipette Eppendorf Reference autoclavable 20 µl, Eppendorf AG, Hamburg) und unter einem Deckglas auf einem beheizten Objektträgertisch (37 °C) betrachtet. Als vorwärtsbeweglich galten die Spermien, die das mikroskopische Gesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung zu 2/3 geradlinig durchquerten. Gemäß dieser Definition wurde der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien an der Gesamtspermienzahl nach Auswertung mehrerer Gesichtsfelder prozentual geschätzt (Hoffmann 2003).

3.3.2 Dichte

Die Messung der Dichte erfolgte bei einer Verdünnung der Probe von 1:200. Hierfür wurden 398 µl Leitungswasser mit 2 µl Spermienprobe in einem 1,5 ml-Eppendorf-Tube (Eppendorf AG, Hamburg) gemischt und die zur Untersuchung erforderliche Menge in die beiden Kammern einer vorbereiteten Neubauer-Zählkammer mit Deckglas (Hämazytometer, Tiefe 0,1 mm, Fläche 0,0025 mm², HBG Henneberg-Sander GmbH, Gießen) pipettiert. Die Auszählung erfolgte bei 400-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop im positiven Phasenkontrast (Mikroskop Hund H 500, Objektiv 40x/0,65, Helmut Hund GmbH, Wetzlar). Für die Schätzung wurden pro Kammer jeweils die Spermienköpfe in 80 Kleinstquadraten ausgezählt, wobei hierfür jeweils fünf nicht direkt aneinander angrenzende Kleinquadrate mit je 16 Kleinstquadraten gewählt wurden. Es wurden nur die Spermienköpfe gewertet, die komplett innerhalb der Kleinstquadrate lagen sowie alle Spermienköpfe, die die untere bzw. linke Begrenzungslinie eines Kleinquadrates schnitten. Als Ergebnis (Z) galt der arithmetische Mittelwert der Auszählungen der beiden Kammern.

Die geschätzte Spermiedichte (Spermienanzahl pro µl) wurde dann mit folgender Formel nach Neubauer berechnet:

$$\text{Dichte (Spermienzahl pro } \mu\text{l)} = (Z \times 4000 \times V) / 80 = Z \times 10000$$

Z= Gesamtzahl der ausgezählten Spermien in 80 Kleinstquadraten

V= Verdünnungsfaktor

Die Gesamtspermienzahl ergab sich aus dem Produkt des Ejakulatvolumens in μl und der Dichte (Zahl der Spermien pro μl) (Christiansen 1984; Hoffmann 2003).

3.3.3 Lebend-Tot-Verhältnis (Eosin-gefärbter Spermienausstrich)

Zur Schätzung des Anteils lebender Spermien wurde eine Eosin-Färbung durchgeführt. Hierfür diente eine Mischung aus Eosin-B, Natriumcitrat und destilliertem Wasser als Färbelösung. 10 μl Färbelösung wurden auf einem Objektträger mit 5 μl Probe für 20 Sekunden vermischt. Ein Teil des Gemisches wurde mit der Kante eines Objektträgers aufgenommen und die Probe auf einem weiteren Objektträger ausgestrichen. Bei 400-facher Vergrößerung wurden 200 Spermien lichtmikroskopisch in negativem Phasenkontrast ausgezählt (Leica CM E, Objektiv E2 PLAN PH 40x/0,65, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar). Spermien mit gefärbten, roten Köpfen, die aufgrund einer geschädigten Plasmamembran den Farbstoff aufnahmen, galten als tot, solche ohne Färbung wurden als lebend gewertet (Hoffmann 2003).

3.3.4 Pathomorphologie (Eosin-gefärbter Spermienausstrich)

Bei der Routineuntersuchung erfolgte die Auswertung der Pathomorphologie am Eosin-gefärbten Spermienausstrich, der schon zuvor für die Beurteilung des Lebend-Tot-Verhältnisses angefertigt worden war. Der getrocknete, gefärbte Objektträger wurde bei 400-facher Vergrößerung in negativem Phasenkontrast betrachtet (Leica CM E, Objektiv E2 PLAN PH 40x/0,65, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) und 200 Spermien wurden visuell auf eventuell vorhandene morphologische Abweichungen untersucht. Als Auszählhilfe diente eine elektronische Zählmaschine (Assistent Counter 345/15, Typ AC-15 PC; Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim). Es wurden alle morphologisch sichtbaren Veränderungen in ihren jeweiligen Ausprägungen erfasst.

3.4 Aufreinigung der Vesikel

Zur Aufreinigung der Vesikel wurden - soweit vorhanden - alle Fraktionen des Ejakulats genutzt. Neben einer einfachen lichtmikroskopischen Kontrolle der einzelnen Fraktionen im positiven Phasenkontrast auf das Vorhandensein von Vesikeln (Mikroskop Hund H 500,

Objektiv 40x/0,65, Helmut Hund GmbH, Wetzlar) erfolgte vor der Aufreinigung wie oben beschrieben stets eine spermatologische Untersuchung der spermienreichen Fraktion.

3.4.1 Ermittlung des Zentrifugationsprotokolls (Vorversuch)

Da die in der Literatur vorhandenen Zentrifugationsprotokolle des Hundes bzw. auch anderer Spezies keine zufriedenstellenden Ergebnisse für die Abtrennung der Vesikel von den Spermien lieferten, wurde ein neues Zentrifugationsprotokoll empirisch etabliert. Als Probenmaterial für die Durchgänge dieser Vorversuche diente das Sperma der klinikeigenen Beagle-Rüden (Rüde 1 und 2). Für die Zentrifugationen im Rahmen des Aufreinigungsprotokolles kamen folgende Zentrifugen zum Einsatz: Laborzentrifuge Typ Rotina 38 mit Rotor 1794 (Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen) für Zentrifugationen bis 1000 g und die Ultrazentrifuge Optima-L 70 mit Rotor TI-50 (Beckman Coulter GmbH, Krefeld) für Ultrazentrifugationen bei 100000 g. Bei der Entwicklung des Protokolls war ein erstes Ziel, eine möglichst spermienfreie, aber vesikelreiche Probe (=Überstand der Zentrifugationen) für die erste Ultrazentrifugation zu erhalten. Hierfür wurden die Proben zunächst bei 800 g für 10 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der Überstand aus der ersten Zentrifugation bei 1000 g für 20 Minuten behandelt. Nach jeder Zentrifugation wurden jeweils sowohl das Pellet als auch der Überstand lichtmikroskopisch im Phasenkontrast auf den Vesikel- bzw. Spermiengehalt kontrolliert. Es stellte sich heraus, dass zahlreiche größere Vesikel im Pellet zusammen mit den Spermien verloren gegangen waren. Um diesen Verlust zu vermeiden, wurde die Umdrehungszahl daraufhin so weit reduziert, dass das Pellet bei lichtmikroskopischer Kontrolle mehrerer Aliquots fast ausschließlich aus Spermien bestand (100g). In zwei weiteren anschließenden Zentrifugationschritten (200 g und 500 g) lag das Augenmerk auf der vollständigen Eliminierung der Spermien aus dem vesikelhaltigen Überstand, wobei es das Ziel war, die niedrigst-mögliche Umdrehungszahl für diesen Zweck zu finden, um den Vesikelverlust in das Pellet gering zu halten. Je nach Ergebnis der lichtmikroskopischen Untersuchung wurde in der Etablierungsphase entweder eine zeitliche Variation bei gleicher Umdrehungszahl oder eine Veränderung der Umdrehungszahl bei gleicher Zentrifugationsdauer vorgenommen. Folgendes Zentrifugationsprotokoll vor der ersten Ultrazentrifugation hat sich hierbei als zielführend erwiesen und wurde für die Aufreinigung der Vesikelpollen im weiteren Verlauf eingesetzt: 100 g, 10 Minuten; 200 g, 5 Minuten; 500 g, 15:30 Minuten. Andere Methoden zur Abtrennung der Spermien, wie z.B. der Einsatz von Filtern unterschiedlicher Porengrößen

(1,2-3 μm) oder eine Dichtegradientenzentrifugation mit Hilfe eines Silikatmediums (SpermFilter[®], Gynemed GmbH & Co.KG, Lensahn), schlugen fehl. Während die Filter keine hinreichende Trennkapazität aufwiesen, gelang mittels Dichtegradientenzentrifugation eine Trennung, allerdings erwiesen sich die Komponenten des Silikatmediums bei weiterer Aufreinigung der Proben als störend, weshalb diese Methode nicht zum Einsatz kam.

3.4.2 Aufreinigungsprotokoll

Der Überstand der Zentrifugation nach oben beschriebenem Protokoll wurde anschließend bei 100.000 g (4 °C) 1 Stunde lang zentrifugiert. Das hieraus resultierende Pellet wurde nach Verwerfen des Überstandes mit 250 μl TRIS-NaCl-Puffer (30 mM TRIS, 130 mM NaCl, pH 7,6) resuspendiert. Die Proteinkonzentration der Probe wurde dann mit Hilfe eines BCA (*Bicinchoninic acid*, englisch für Bicinchonininsäure)-Kits (Pierce[™] BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) bei 540 nm geschätzt (iEMS Reader MF, Typ 1401, MTX Lab Systems Inc., Virginia, USA). Diese Messung war essentiell für die nachfolgende Gelchromatographie, um eine Überladung der Säule zu vermeiden.

Zur Herstellung der Säule für die Gelchromatographie musste zunächst das benötigte Gelvolumen (=Säulenvolumen) berechnet werden. Dies erfolgte mittels nachstehender Formel: Säulenvolumen = $\pi \times (\text{Radius der Säule in cm})^2 \times \text{Höhe der Säule (cm)}$. Anhand dieses Volumens ließ sich die erforderliche Menge an Trockensubstanz des Mediums Sephadex G-200 (1 g Sephadex G-200 Trockensubstanz pro 30-40 ml benötigtem Volumen, Pharmacia Fine Chemicals Inc., Uppsala, Schweden) berechnen. Die Trockensubstanz wurde in TRIS-NaCl-Puffer (30 mM TRIS, 130 mM NaCl, pH 7,6) gegeben. Das Volumen des Puffers umfasste das Säulenvolumen inklusive zusätzlichen 30% dieses Volumens. Dieser Ansatz wurde zur Beschleunigung des Quellvorgangs 5 h im Wasserbad auf 90 °C erhitzt. Diese Erhitzung verhinderte Luftblaseneinschlüsse im Gel. Um langfristig eine mikrobielle Belastung der Säule zu verhindern, wurde zusätzlich eine Spatelspitze NaN_3 (0,02%) in den Ansatz gegeben. Nach dem Abkühlen wurde der wässrige Überstand entfernt und das Gel zum Packen der Säule genutzt. Die leere Säule (Glass Econo-Column, 15 cm x 1,5 cm, BioRad Laboratories GmbH, München) wurde hierfür senkrecht in einem Stativ fixiert und das Säulenende mit einem Gummischlauch passenden Durchmessers verbunden. Die Säule wurde zu etwa $\frac{1}{4}$ mit Laufpuffer (30 mM TRIS, 130 mM NaCl, pH 7,6) gefüllt und die Flüssigkeit bis zu einem

Restvolumen von etwa 0,2 ml abgelassen. Dann wurde die Säule verschlossen. Nach leichtem Schwenken des Gels wurde die nötige Gel-Menge in einem Guss in die Säule eingegeben und mit Laufpuffer überschichtet. Der Abfluss wurde dann erneut geöffnet, sodass die Flüssigkeit abfließen und die Gelpartikel sich absetzen konnten. Zur Äquilibration und Stabilisierung der Säule wurde mindestens das dreifache Säulenvolumen an Laufpuffer auf die Säule gegeben. Für den Durchlauf wurden keine zusätzlichen, druckerzeugenden Hilfsmittel benutzt. Er wurde ausschließlich durch die Schwerkraft angetrieben. Vor dem Einsatz der Säule in der Probenpräparation wurde zunächst eine Farblösung auf die Säule pipettiert (Dextranblau, 2 mg/ml, 1 ml Probenaufgabe). Dies sollte einerseits durch die Anfärbung des Gels die Homogenität der Säule verifizieren und diente andererseits der Ermittlung des Ausschlussvolumens, da das Dextranblau als Molekül nicht in die Gelporen eindrang und somit den schnellsten Weg durch die Säule zurücklegte. Die Aufbewahrung der Säule sowie alle Proben-Aufarbeitungen geschahen bei 4°C in einem Kühlschrank. Die fertige Säule wurde für mehrere Probenläufe im Rahmen der Vesikelaufreinigung genutzt und nach jedem Probenlauf mit Laufpuffer (dreifaches Säulenvolumen) gewaschen. Ein Austrocknen der Säule war zu vermeiden. Zur Probenaufgabe wurde die Säule verschlossen, nachdem der Spiegel des Laufmittels an der Säulenoberfläche auf den tiefstmöglichen Stand gesunken war. Daraufhin wurde die vesikelhaltige Probe luftblasenfrei auf die Oberfläche des Gelbettes aufgegeben. Es war darauf zu achten, dass die aufgegebene Proteinmenge maximal 800 µg betrug. Außerdem durfte das aufgegebene Probenvolumen maximal 30% des Säulenvolumens betragen. Wenn der Proteingehalt einer Probe diesen Wert überschritt, wurde die Probe entsprechend auf mehrere Säulen aufgeteilt, um die Trennkapazität der Säule nicht zu überlasten. Im Anschluss an die Probenaufgabe wurde die Säule geöffnet und die Elution damit gestartet. Sobald die Probenflüssigkeit in die Säulenoberfläche eingesickert war, wurde weiteres Laufmittel aufgegeben, um ein Trockenlaufen der Säule zu verhindern. Das Eluat wurde in 32 vorbereiteten 1,5 ml Eppendorf-Tubes aufgefangen, die alle 3 Minuten ab Beginn der Elution per Hand gewechselt wurden. Aliquots von je 25 µl jeder einzelnen Fraktion wurden in eine 96-Well-Platte (Cellstar®, Tissue culture plate 96-W, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) pipettiert und deren Absorption am Ende der Elution bei 540 nm mit Hilfe des oben genannten BCA-Kits gemessen (iEMS Reader MF, Typ 1401, MTX Lab Systems Inc., Virginia, USA). In Abb. 2 ist das Ergebnis dieser Messung graphisch dargestellt. Da die Vesikel nicht von der Säule zurückgehalten wurden, befanden sie sich im

Ausschlussvolumen, das vorher mit Hilfe von Dextran-Blau ermittelt worden war und sich graphisch im ersten Peak des Elutionsdiagrammes darstellte. Die entsprechenden vesikelhaltigen Fraktionen wurden gepoolt und erneut einer Ultrazentrifugation bei 100.000 g für 1h bei 4 °C unterzogen. Der resultierende Überstand wurde verworfen und das Pellet vesikulären Inhalts entweder direkt zur weiteren Analyse verwendet oder bis zum Gebrauch bei -25 °C aufbewahrt

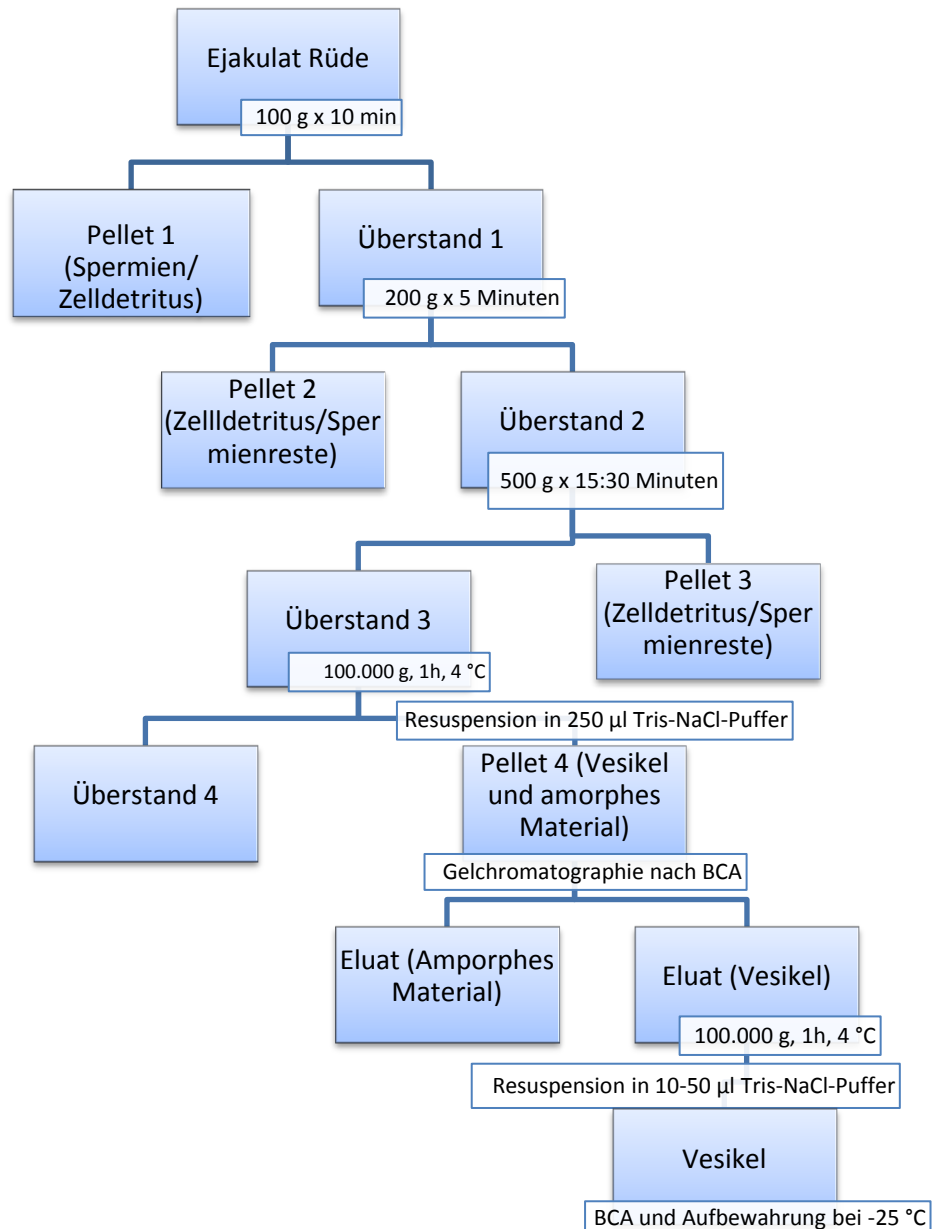


Abb. 1: Protokoll zur Aufreinigung der reinen Vesikelpollen aus dem caninen Ejakulat

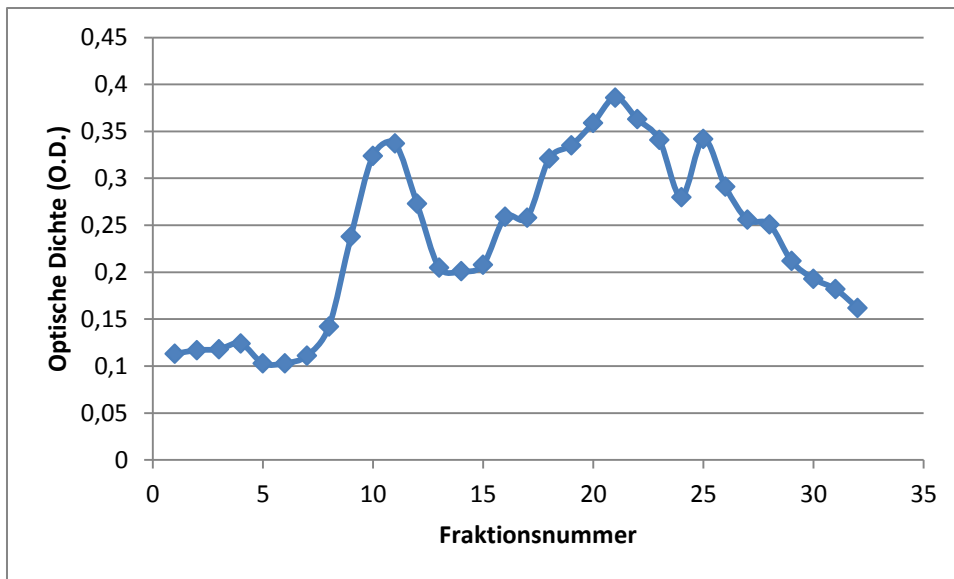


Abb. 2: Beispiel eines Elutionsdiagramms von Rüde 11.

Die optische Dichte der 32 gesammelten Fraktionen wurde gemessen und graphisch dargestellt. Der zeitliche Abstand zwischen den Fraktionen betrug 3 Minuten. Der erste Peak entsprach dem Ausschlussvolumen und der vesikelhaltigen Fraktion. Die darauffolgenden Peaks stammten von amorphen Proteinen aus dem Seminalplasma (Ronquist und Brody 1985).

3.4.3 Proteinbestimmung mittels BCA-Kit

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Proben gibt es verschiedene Methoden. Allen ist gemeinsam, dass zunächst nach dem jeweiligen Verfahren eine Standardkurve - meist unter Verwendung von bovinem Serumalbumin als Standardprotein - erstellt wird. Auf der Basis dieser Standardkurve kann dann die Proteinkonzentration einer unbekannten Probe mittels linearer Regression ermittelt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kits gemessen. Dieses enthielt zwei Reagenzien. Reagenz A bestand aus Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Natriumtartrat und Bicinchoninsäure (BCA) in 0,1 M Natriumhydroxidlösung. Reagenz B war eine 4%ige Kupfersulfatlösung. Diese beiden Reagenzien wurden für den Versuchsansatz im Verhältnis 50:1 (A:B) gemischt. BCA reagierte in alkalischer Lösung mit Cu^{2+} und bildete apfelgr ne Komplexe. In Gegenwart von Protein wurde Cu^{2+} aufgrund einer Interaktion mit Peptidbindungen der Proteine zu Cu^+ reduziert. Der Komplex aus Cu^+ mit jeweils 2 BCA-Molekülen war violett und das Absorptionsmaximum lag bei 562 nm, weshalb die Proben nahe dieses Maximums bei 540 nm gemessen wurden.

Der Messbereich des Tests lag zwischen 20-2000 µg Protein/ml, wo sich die Absorption bei steigender Proteinkonzentration annähernd linear verhielt. Zur Erstellung der Standardkurve wurden 9 Eppendorf-Röhrchen (à 1,5 ml) entsprechend der Tab. 3 vorbereitet.

Tab. 3: Vorbereitung der Standardreihe zur Schätzung der Proteinkonzentration mittels BCA-Kit aus „Instructions“ des Pierce™ BCA Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA)

Standardnr.	BSA-Lösung (µl)	Aqua dest. (µl)	Endkonzentration (µg/ml)
1	300 (aus Stocklösung, 2 mg/ml)	0	2000
2	375 (aus Stocklösung, 2 mg/ml)	125	1500
3	325 (aus Stocklösung, 2 mg/ml)	325	1000
4	175 aus Standard 2	175	750
5	325 aus Standard 3	325	500
6	325 aus Standard 5	325	250
7	325 aus Standard 6	325	125
8	100 aus Standard 7	400	25
9	0	400	0

Aus jedem Eppendorf-Röhrchen wurden jeweils 25 µl auf die Felder A 1-9 und B1-9 einer 96-Well-Platte (Cellstar®, Tissue culture plate 96-W, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) gegeben, sodass zwei Standardreihen im Doppelansatz gemessen werden konnten. Die Proben wurden im Verhältnis 1:5, 1:10 und 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt. Dies geschah, um mit möglichst geringem Probenvolumen eine hohe Anzahl an Werten für die gleiche Probe produzieren und damit die Schätzungsgenauigkeit erhöhen zu können. Jeweils 25 µl der unverdünnten Probe sowie der Verdünnungen 1:5, 1:10 und 1:20 wurden im Doppelansatz auf die Felder C 1-4 und D 1-4 der 96-Well-Platte aufgetragen. Im Anschluss wurde in alle befüllten Wells je 200 µl des Reagenzgemisches hinzugegeben. Nach Durchmischung der Proben mit dem Reagenzgemisch auf dem Taumel-Schüttler (Typ Reax 3, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach) für 30 Sekunden erfolgte die Inkubation der 96-Well-Platte bei 37 °C für 30 Minuten in einem Wärmeschrank (Typ FB 420, Heraeus Holding GmbH, Hanau). Zur Auswertung wurde eine Messung der optischen Dichte der

beladenen Wells bei 540 nm mit Hilfe eines automatischen Plattenlesers durchgeführt (iEMS Reader MF, Typ 1401, MTX Lab Systems Inc., Virginia, USA). Anhand der resultierenden Werte konnte mittels Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation) eine Standardkurve erstellt werden, die zur Ermittlung der unbekannten Probenkonzentrationen diene.

Die Proteinkonzentrationsbestimmung der einzelnen, eluierten Fraktionen erfolgte nicht im Doppelansatz, sondern lediglich einfach an 25 µl der unverdünnten Probe.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Vesikelpuben am Ende der Aufreinigung nach der zweiten Ultrazentrifugation wurden aufgrund des geringen Probenvolumens nur 2 µl Probe eingesetzt, die mit 23 µl Puffer (30 mM TRIS, 130 mM NaCl, pH 7,6) in einem einfachen Ansatz verdünnt wurden. Der Verdünnungsfaktor wurde bei der Berechnung der Konzentration entsprechend berücksichtigt.

3.5 Elektronenmikroskopie

3.5.1 Gewinnung der Vesikelpuben (Vorversuch)

In Vorversuchen wurden drei unterschiedliche Probenaufbereitungsarten vor der Einbettungsphase an drei getrennt gewonnenen Samenproben desselben Rüden (Rüde 1) hinsichtlich der Auswertbarkeit in der transelektronenmikroskopischen Darstellung verglichen. Die Proben bestanden jeweils aus Vorsekret, spermienreicher Fraktion und Prostatasekret. Für die Aufarbeitung wurden Aliquots der Ursprungsproben in 1,5 ml-Eppendorf-Tubes pipettiert. Eine dieser Proben wurde ohne weitere Behandlung einmalig bei etwa 13000 g (Biofuge fresco, Heraeus, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau) zentrifugiert und direkt nachfolgend eingebettet. In einem weiteren Ansatz erfolgte die Aufreinigung der Probe nach dem oben beschriebenen Aufreinigungsprotokoll bis zum Ende der zweiten Ultrazentrifugation. Der dritte Versuchsansatz umfasste zwei aufeinanderfolgende Zentrifugationen bei 100 g (Rotina 38, Rotor 1794, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen) und Rückgewinnung des Überstandes nach Zentrifugation bei 100000 g (Optima L-70, Rotor TI-50, Beckman Coulter GmbH, Krefeld). Alle drei gewonnenen Probenpellets wurden getrennt voneinander eingebettet, aufbereitet und im Elektronenmikroskop betrachtet.

Da die Aufreinigung der Probe bis zum Ende der zweiten Ultrazentrifugation mit einem zu hohen Verlust an Probenmaterial einherging und die Variante der unaufbereiteten Probe ein

recht dichtes, elektronenmikroskopisches Bild lieferte, das die Beurteilung einzelner Vesikel erschwerte, wurde im weiteren Verlauf die Probe vor der Einbettung zunächst bei 100 g und nachfolgend bei 100000 g zentrifugiert.

3.5.2 Aufbereitung der Proben für die Elektronenmikroskopie

Zu Beginn wurde das in 100 µl TRIS -NaCl-Puffer (30 mM TRIS, 130 mM NaCl, pH 7,6) resuspendierte Pellet, das nach der ersten Ultrazentrifugation des Aufreinigungsprotokolles entstanden war, in ein 200 µl- Tube (Multi®-Ultra PCR-Tubes 0,2 ml, Carl Roth GmbH & Co KG) überführt und zur Erzeugung eines neuen Probenpellets erneut bei etwa 13.000 g (Biofuge fresco, Heraeus, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau) zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen, während das vesikelhaltige Pellet mit etwa 100 µl 6%iger Glutaraldehydlösung zur Fixierung der Proteine überschichtet wurde. Die Glutaraldehydlösung wurde jeweils kurz vor Gebrauch aus 25%iger Glutaraldehydlösung und Cacodylatpuffer (0,1 M) in der benötigten Menge angesetzt.

Nach einer Fixierungsdauer von 4-6 Stunden folgten drei Waschungen in je 50 µl Cacodylatpuffer (0,1 M) für jeweils 10 Minuten. Zwischen diesen Waschschritten wurde das vesikelhaltige Pellet - falls erforderlich - durch Zentrifugation erneut gefestigt. Danach schloss sich eine weitere Fixierung in 1%-iger Osmiumsäure für 1-2 Stunden an. Dies sorgte für eine Fixierung der Lipidsubstanzen und eine Stabilisation der zellulären Membranen in der Probe.

Nach weiteren drei Waschungen in Cacodylatpuffer (0,1 M) für je 2-3 Minuten wurde die Probe in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol) wie folgt entwässert: 2-3 Minuten in 50%igem Alkohol, 15 Minuten in 70%igem Alkohol, 15 Minuten in 80%igem Alkohol, 15 Minuten in 96%igem Alkohol, dreimal je 15 Minuten und einmal 45 Minuten in 100%igem Alkohol.

Im Anschluss daran wurde die Probe dreimal für je 10 Minuten mit je 50 µl Xylol versetzt und daraufhin über Nacht in einem Epon-Xylolgemisch (1:1) gehalten. Am nächsten Tag wurde das Pellet in reines Epon gegeben, worin die Probe 4-6 Stunden bei Raumtemperatur in einem offenen 200 µl- Tube belassen wurde, damit das restliche Xylol verdampfen konnte. Danach erfolgte die Polymerisation des Epons im Brutschrank für 20 h bei 60 °C.

Die weitere Aufbereitung, d.h. das Trimmen, die Erstellung von Semi- und Ultradünnschnitten, das Aufziehen der Probe auf Kupfernetzchen und die nachfolgende

Schnittkontrastierung wurde von Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Anatomie, -Histologie und Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen übernommen.

3.5.3 Deskriptive und statistische Auswertung

Die ultrastrukturelle Darstellung erfolgte mit Hilfe eines Transelektronenmikroskops (Zeiss Elektronenmikroskop EM 109, Carl Zeiss AG, Oberkochen) und eines Kamerasystems (Slow Scan CCD Camera, 2k, Wide angle, TRS, Albert Tröndle, Moorenweis). Pro Probe wurden insgesamt jeweils 15-20 Bilder unterschiedlicher Probenausschnitte in drei verschiedenen Vergrößerungsstufen (3000-fach, 12000-fach und 50000-fach) zur späteren Auswertung unter Verwendung der Software Image SP (Version 1.1. 4. 62, TRS, Albert Tröndle, Moorenweis) digital gespeichert.

Die einfache deskriptive Auswertung erfolgte an Bildern in 3000-facher, 12000-facher und 50000-facher Vergrößerung. Es wurden insbesondere die Eigenschaften der vesikulären Strukturen und deren Lage zu den Spermien beurteilt.

Für die Messung der Vesikeldurchmesser wurden digitale Bilder in 12000-facher Vergrößerung genutzt. Die Messung wurde mit Hilfe der Software ImageJ (Version 1.45s, National Institute of Health, USA) durchgeführt.

Die Ergebnisse aus der deskriptiven Auswertung bezüglich der Einteilung der Vesikeltypen wurden für die Messungen der Vesikeldurchmesser zugrunde gelegt. Für jeden Probanden wurden abhängig von der Verfügbarkeit die Durchmesser von maximal 50 Vesikeln jedes Typs gemessen, wobei die Typen C und D sowie F und G aufgrund ähnlicher Größen für diese Messung zusammengefasst betrachtet wurden. Die Auswahl der einzelnen, gemessenen Vesikel geschah zufällig. Die Vesikel des Typs L wurden nicht gemessen. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Funktionen des Programmes Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation) durchgeführt. Hierbei wurden die Messungen für die acht Vesikelgruppen zum einen typenspezifisch (arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung) und zum anderen in einer Gesamtanalyse aller erhobenen Daten unabhängig von der Typenzugehörigkeit (gewichteter, arithmetischer Mittelwert) beurteilt.

Zur Auswertung der Häufigkeitsverteilung wurden die digitalen Bilder der Vesikel in 12000-facher Vergrößerung herangezogen. Es wurden alle elf Vesikeltypen berücksichtigt. Die vorhandenen Bilder wurden für jeden einzelnen Probanden in aufsteigender Reihenfolge beginnend bei 1 mit ganzen Zahlen durchnummeriert. Mit Hilfe eines Taschenrechners (TI-

30XIIS, Texas Instruments, Dallas, USA) wurde eine ganze Zufallszahl im Bereich der Zahlenfolge generiert und so ein Bild zufällig ausgewählt. Alle Vesikel dieses Bildes wurden ausgezählt, wobei gleichzeitig die Typenzugehörigkeit ermittelt wurde. Falls hierfür Messungen des Durchmessers nötig waren, kam das Programm ImageJ (Version 1.45s, National Institute of Health, USA) zum Einsatz. Dieses Verfahren wurde so lange wiederholt, bis die Anzahl der gezählten Vesikel im Bereich von 200 lag. Für jeden Probanden sowie für die Gesamtheit aller gezählten Vesikel wurden sowohl die absoluten als auch die prozentualen Häufigkeiten der 11 Typen ermittelt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels des Programmes Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation).

3.6 Proteinanalyse

3.6.1 SDS-PAGE

Um einen ersten Überblick über das Proteinspektrum der Vesikel hinsichtlich der Protein-Größenverteilung zu erhalten, wurde die SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) mit nachfolgender Gel-Färbung durchgeführt. Hierfür wurde sowohl die Coomassie G-250 (PageBlue™ Protein Staining Solution, Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte), als auch die sensitivere Silberfärbung (Pierce Silver Stain Kit, Thermo Fisher Scientific, Schwerte) genutzt.

Für die Herstellung der Gele, die später mittels Coomassie-G-250-Färbelösung angefärbt wurden, fand das DualGelCaster-System von Höfner Anwendung (Geldaten: 10 x 10 cm, Geldicke 0,75 mm, 10 Wells). Für die Silberfärbung fanden sowohl die oben genannten Vorrichtungen als auch diejenigen von BioRad (8 x 9 cm, Geldicke 0,75 mm, 10 Wells) Verwendung.

Da analog zu Ergebnissen anderer Spezies ein weites Proteinspektrum und Proteine im niedrigen Molekularbereich zu erwarten waren, wurde die Untersuchung mit einem 11,5%igen Acrylamid-Gel durchgeführt. Die Rezepturen des Trenn- und Sammelgels finden sich im Anhang.

Alle Vorrichtungen des jeweiligen GelCasters wurden gewaschen, mit Ethanol entfettet und anschließend nach Anleitung des Herstellers zusammengebaut. Zur Markierung der Trenngelhöhe des Gels wurde der Kamm in die leere Vorrichtung eingesteckt und im Abstand von etwa 0,5 cm unterhalb der Unterkante des Kamms ein Markierungszeichen auf

die Glasplatte gesetzt. Der Kamm wurde entfernt und das Trenngel (11,5%) in einem 100 ml-Becherglas auf Eis unter dem Abzug angesetzt. Danach wurde das Gemisch in die GelCaster-Vorrichtung pipettiert, bis die Höhe der Markierung erreicht war, und mit 200 µl Isopropanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu gewährleisten. Nach 45 Minuten Polymerisationszeit wurde die Isopropanollösung abgegossen, die Oberkante des Trenngels mit etwa 1ml Aqua bidestillata nachgespült und die restliche Flüssigkeit mit einem Filterpapier vorsichtig abgezogen. Nun wurde der Kamm wieder eingesteckt und die freien Bereiche zwischen Trenngel und Kamm mit Sammelgel aufgefüllt. Das Sammelgel (5%) wurde ebenfalls in einem 100 ml-Becherglas kurz vor Gebrauch angesetzt und nach Eingabe 30 Minuten zur Polymerisation belassen.

Während der Polymerisation wurden die Proben vorbereitet. Der Proteingehalt der Probe zur optimalen Darstellung des Proteinspektrums wurde vorher durch einen Vergleich der Ergebnisse aus steigenden Proteingehalten ermittelt. Entsprechend wurden für die Coomassie-G250-Färbung mindestens 20 µg Vesikelprotein und für die Silberfärbung etwa 1 µg Vesikelprotein eingesetzt. Die Proteinkonzentrationen der Vesikelpuben wurden im Voraus mittels BCA-Kit (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Schwerte) bestimmt.

Pro Well wurden 16 µl Probengemisch einpipettiert. Dies setzte sich aus 4 µl Probenpuffer (Probenauftragspuffer, Rezeptur siehe Anhang) und 12 µl Probe zusammen. Falls das Probenvolumen 12 µl unterschritt bzw. eine Probenverdünnung nötig war, wurde destilliertes Wasser zur Auffüllung des Volumens genutzt. Diese Ansätze wurden vor der Probenaufgabe in 1,5 ml –Eppendorf-Tubes für 3 Minuten bei 95 °C zur Hitzedenaturierung der Proteine erhitzt (Thermoblock Model TM 130-6, HLC-Haep Labor Consult, Bovenden). Die Abkühlung der Proben geschah auf Eis.

Die polymerisierten Gele wurden in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt und der Raum zwischen den eingesetzten Gelen vollständig mit Laufpuffer (Rezeptur siehe Anhang) gefüllt. Vorsichtig wurde der Kamm entfernt, um die Taschen der Gele freizulegen, die nun mit Laufpuffer geflutet wurden. Mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette wurden die Proben luftblasenfrei aufgenommen und nacheinander in die Geltaschen pipettiert.

Pro Gel wurde in mindestens ein Well 5 µl PageRuler® Prestained Protein Ladder (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte) eingegeben, um die Proteingrößen der unbekannten Proben später schätzen zu können. Die Elektrophorese fand bei konstanter

Spannung unter folgenden Bedingungen statt: 100 Volt für die ersten 30 Minuten (bis Erreichen des Übergangs von Sammel- zu Trenngel durch die Proben), danach 120 Volt bis zum Ende der Auftrennung.

3.6.1.1 Coomassie-Färbung

Die Coomassie G-250-Färbung (Detektionslimit: 5 ng Protein pro Spot) wurde mithilfe der PageBlue™ Protein Staining Solution nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurde das Gel in einem mikrowellenfesten Plastikgefäß dreimal für je 5 Minuten in 100 ml destilliertem Wasser gewaschen, um eine spätere Interferenz zwischen der Substanz SDS und dem Farbstoff zu vermeiden. Pro Waschvorgang verbrachte das Gel je 1 Minute bei mittlerer Hitze (360 Watt) in einer herkömmlichen Mikrowelle und 4 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Taumelschüttler (Typ REAX 3, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach). Die Färbung erfolgte in 20 ml Färbelösung für 30 Sekunden in der Mikrowelle (360 Watt) und anschließend für weitere 20 Minuten auf dem Schüttler. Danach wurde die Färbelösung abgegossen und das Gel nochmals für 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen.

3.6.1.2 Silber-Färbung

Um auch Proteine erkennen zu können, die in sehr geringer Menge vorhanden waren, wurde eine Silberfärbung durchgeführt (Detektionslimit: > 0,25 ng Protein pro Spot). Sie erfolgte ebenfalls mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits nach den Vorgaben des Herstellers (Pierce Silver Stain Kit, Thermo Fisher Scientific, Schwerte).

Das Gel wurde zunächst mit destilliertem Wasser gewaschen. Zur Fixierung der Proteine wurde dann eine Lösung aus 50%igem Ethanol und 10%iger Essigsäure zu dem Gel hinzugefügt und der Ansatz für 30 Sekunden in der Mikrowelle bei mittlerer Hitze erhitzt. Nach weiteren 10 Minuten auf dem Taumelschüttler wurde die Fixierlösung gegen eine 30%ige Ethanolösung ersetzt. Wiederum wurde das Gel 30 Sekunden in der Mikrowelle (360 Watt) erwärmt und danach 10 Minuten auf dem Schüttler belassen. Anschließend erfolgte ein zweimaliger Waschvorgang mit destilliertem Wasser für je 20 Sekunden. Nachdem das Gel für 1 Minute in der mitgelieferten „Sensitizing Solution“ für die weiteren Färbeschritte vorbereitet und erneut zweimal in destilliertem Wasser gewaschen worden war, erfolgte die

eigentliche Färbung des Gels durch Versetzen desselben mit Färbelösung für 20 Minuten. Zwei weiteren Waschvorgängen folgte die Entwicklung des Gels in „Developing solution“. Die Entwicklungsphase wurde durch Zugabe von Essigsäure gestoppt, sobald die Proteinbanden gut sichtbar angefärbt waren.

3.6.1.3 Gelkonservierung

Bei Bedarf wurde das Gel konserviert, indem es nach der Färbung für 30 Minuten in Gelkonservierer eingelegt wurde (Rezeptur siehe Anhang).

Ein zur Gelgröße passender Rahmen wurde mit feuchter Einmachfolie bespannt und das Gel zwischen zwei Blättern dieser Folie mechanisch zum Trocknen fixiert.

3.6.2 MALDI-TOF-MS

Für die Aminosäuresequenzanalyse verschiedener optisch dominanter Banden wurden Vesikel-Proben sechs verschiedener Probanden wie oben beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel anschließend mit Silber gefärbt (Geldaten: Gelgröße: 10 x 10 cm, Geldicke: 0,75 mm, 10 Wells, Acrylamidgehalt des Gels: 11,5%). Aus diesem Gel wurden 23 verschiedene Banden unterschiedlichen Molekulargewichts mit Hilfe eines sterilen Skalpell aus geschnitten und je einzeln in sterile 0,5 ml-Tubes (Low binding Reagiergefäß, Sarstedt AG & Co, Numbrecht) gegeben. Darunter befanden sich 4 Banden identischen Molekulargewichts (15 kDa) von 4 unterschiedlichen Rüden, 5 Banden identischen Molekulargewichts (25 kDa) von 5 unterschiedlichen Rüden, 4 Banden identischen Molekulargewichts (30 kDa) von 4 unterschiedlichen Rüden, 4 Banden identischen Molekulargewichts (40 kDa) von 4 unterschiedlichen Rüden, 3 Banden identischen Molekulargewichts (70 kDa) von 3 unterschiedlichen Rüden und 3 Banden identischen Molekulargewichts (über 100 kDa) von 3 unterschiedlichen Rüden.

Diese Proben wurden von den Mitarbeitern des Instituts für Biochemie, Fachbereich Medizin, der Justus-Liebig-Universität Gießen mit dem Ziel der MALDI-TOF-Analyse aufbereitet und analysiert.

3.7 Lipidanalyse

Zur Analyse der Lipidzusammensetzung der Vesikel wurden reine Vesikelproben von insgesamt 15 Rüden unterschiedlicher Rassen untersucht. Nach der Lipidextraktion erfolgte die Bestimmung der Gehalte an den Phospholipiden Sphingomyelin, Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin mittels HPTLC (High-performance thin-layer chromatography) und anschließender Densitometrie der Iod-gefärbten Analyseplatten, während die Cholesterolbestimmung mit Hilfe eines kommerziellen Kits (EnzyChrom™ Cholesterol Assay Kit ECCH-100, Bio Assay Systems, Biotrend Chemikalien GmbH, Köln) durchgeführt wurde. Für 9 der 15 Hunde erfolgte die Gehaltsermittlung von Cholesterol sowie Phospholipiden aus demselben Ejakulat, zum Teil aus unterschiedlichen Aliquots der jeweiligen Probe. Rüde 1 und 2 wurden für die Untersuchungen mehrfach abgesamt und die Ergebnisse stammen somit aus verschiedenen Ejakulaten. Für die Lipidgehaltsbestimmung von drei Probanden (Rüde 9, 19 und 20) wurde aufgrund von mangelndem Probenmaterial ausschließlich eine HPTLC durchgeführt, an einer weiteren Probe (Rüde 17) fand lediglich die Bestimmung des Cholesterolgehaltes statt.

3.7.1 Ansetzen der Lipidstandardlösungen

Zunächst wurden Lösungen der zu untersuchenden Lipide Cholesterol, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin und Sphingomyelin als Standardlösungen wie folgt angesetzt.

Cholesterol: 0,5 mg/ml, gelöst in Methanol (HPLC-grade)

Sphingomyelin: 0,2 mg/ml, gelöst in Ethanol (HPLC-grade)

Phosphatidylcholin: 0,1 mg/ml, gelöst in Methanol (HPLC-grade)

Phosphatidylethanolamin: 0,1 mg/ml, gelöst in Methanol (HPLC-grade)

Für die Herstellung von sphingomyelin-, cholesterol- und phosphatidylcholinhaltigen Lösungen, deren Ausgangsprodukte in Pulverform vorlagen, wurde eine entsprechende Menge des Lipids mit Hilfe einer Analysewaage eingewogen und dann im Lösungsmittel (Methanol bzw. Ethanol, siehe oben) unter Rühren gelöst. Phosphatidylethanolamin, das in Chloroformlösung geliefert wurde, wurde zunächst eingedampft, um es dann erneut in Methanol zu lösen. Anschließend wurden je 0,5-1 ml der Lösungen in mehrere Borosilikatgläschen mit konischem Spitzboden und Teflonverschluss gefüllt. Dies geschah auf

Eis, um das Verdampfen von Lösungsmittel und damit eine Veränderung der Konzentration möglichst gering zu halten. Die Aliquots wurden bei -25 °C bis zum Gebrauch lichtgeschützt gelagert.

3.7.2 Lipid-Extraktion nach Folch (modifiziert)

Das Vorgehen bei der Lipid-Extraktion orientierte sich an dem Protokoll von Folch et al. (1957). Um eine einheitliche Behandlung und damit eine Auswertbarkeit zu erreichen, wurden sowohl die Standards als auch die Proben einer Lipidextraktion unterzogen.

Die Standard- bzw. Vesikelpuben wurden zunächst, falls erforderlich, mit dem jeweiligen Lösungsmittel, in welchem sie sich in Lösung befanden, in einem 1,5 ml Eppendorf-Tube auf 50 µl Gesamtvolumen verdünnt. Für jede Vesikelprobe fand kurz vor der Lipidanalyse eine Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Kit (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Schwerte) statt. Dies war wichtig, um in Anlehnung an die vorhandenen Werte aus der Literatur nach der Lipidanalyse eine Bezugsgröße für die Lipidgehalte zu haben und letztere untereinander vergleichen zu können. Pro Probe wurden 20 µg Vesikelprotein eingesetzt, weil sich diese Menge in Vorversuchen als ideal zur Untersuchung herausgestellt hatte. Aufgrund der geringen Menge an Probenmaterial war allerdings der Einsatz dieser Menge nicht bei allen Probanden möglich und musste zum Teil reduziert werden.

Für die Lipidextraktion wurde nun in einem weiteren 1,5 ml- Eppendorf-Tube eine Mischung aus Chloroform und Methanol (2:1) angesetzt und im Verhältnis 20:1 zur Probe gegeben. Das verschlossene Eppendorf-Tube wurde im Anschluss für eine Dauer von 15 Minuten auf dem Rotationsmischer (Typ 3300, Eppendorf Gerätebau, Netheler & Hinz GmbH, Hamburg) kräftig geschüttelt. Danach wurde 20% (v/v) destilliertes Wasser zur Probe gegeben. Dieses Gemisch wurde nochmals 1 Minute auf dem Rotationsmischer durchmischt und dann bei etwa 320 g (Biofuge fresco, Heraeus, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau) für 10 Minuten zentrifugiert, um die Phasentrennung zu beschleunigen. Die obere, wässrige Phase, die Ganglioside und kleine, organische, polare Moleküle beinhaltete, wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Um restliche Nicht-Lipid-Substanzen zu entfernen, wurde der Bereich der oberen Phase daraufhin vorsichtig mit einem nach Folch (1957) angesetzten Lösungsmittel („pure solvent upper phase“) gewaschen, möglichst ohne die untere Phase zu

beeinflussen. Die untere Chloroform- und lipidhaltige Phase wurde danach zur weiteren Bearbeitung und Analyse genutzt. Hierfür wurde das Volumen des Lipidextrakts zunächst auf zwei Eppendorf-Tubes aufgeteilt und die Aliquots wurden eingedampft. Die Aufteilung der Probe geschah, um nur ein möglichst kleines Volumen vor dem Verdampfen des Lösungsmittels im Gefäß belassen zu müssen und um auf diese Weise den Verlust von Lipiden durch deren Adhäsion an der Gefäßwand zu minimieren. Nach der vollständigen Eintrocknung wurden die Gefäßwände aus demselben Grund erneut mit 100 µl Chloroform-Methanol-Lösung (1:1) gespült, wobei die Resuspension der Probe durch kurzzeitiges Einbringen des Probengefäßes in ein Ultraschallwasserbad (Ultraschallgenerator T-460-H, Laboson 200, Bender & Hobein GmbH, Bruchsal) unterstützt wurde. Daraufhin wurde die Probe wiederum eingedampft, bevor sie letztendlich nach einer dritten, ebenfalls Ultraschall-gestützten Resuspension in 50 µl Chloroform-Methanol-Mischung (1:1) auf die Platte aufgegeben wurde.

Da sich die Mischung von Chloroform: Methanol (1:1, v/v) im Vergleich zu den Ansätzen Chloroform:Methanol (v/v) 0,5:1 bzw. 1,5:1 bzw. 2:1 in den Messungen der Vorversuche im Hinblick auf die letztendliche Sphingomyelin-, Phosphatidylcholin- und Phosphatidylethanolamin-Ausbeute als effektiver herausstellte, wurde in diesem Punkt von den Empfehlungen von Folch et al. (1957) (Chloroform: Methanol, 2:1 (v/v)) abgewichen.

3.7.3 Dünnschichtchromatographie

3.7.3.1 Vorversuche

Zur Ermittlung der optimalen Bedingungen für die Durchführung der Dünnschichtchromatographie erfolgten zunächst einige Vorversuche.

3.7.3.1.1 Ermittlung der Laufbedingungen

Zu allererst musste ein passendes Laufmittel zur Auftrennung der Lipide gefunden werden. Die CCBS-Datenbank (Cumulative CAMAG Bibliography Service, www.camag.com) diente hier zur Recherche, um einen ersten Überblick über die vorhandenen bzw. bereits erprobten methodischen Möglichkeiten zu erhalten.

Das generelle methodische Vorgehen in den Vorversuchen unterschied sich nicht von dem, das bei der Probenanalyse Anwendung fand, und ist dort ausführlich beschrieben. Abweichend davon wurden für einen Großteil der Vorversuche DC (Dünnschichtchromatographie)-Platten (DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck KGaA, Darmstadt) anstatt der weiter unten erwähnten HPTLC-Platten (HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄, Merck KGaA, Darmstadt) verwendet.

Folgende Laufmittelzusammensetzungen wurden vorab getestet:

- 1) Laufmittel 1 Chloroform:Methanol:Essigsäure:A.dest. (40:10:10:1)
Laufmittel 2 Chloroform:Methanol:Essigsäure:A.dest. (120:46:19:3)
(nach Piehl et al. 2006)
- 2) Laufmittel Chloroform:Methanol:A.dest (65:25:4)
(nach Gennaro et al. 1996)
- 3) Laufmittel 1: Methylacetat:1- Propanol : Chloroform:Methanol:0,25% KCl
(25:25:25:10:9)
(nach Vuorela et al. 1996)
- 4) Laufmittel 1: Methylacetat:1-Propanol:Chloroform:Methanol:0,25% KCl
(25:25:25:10:9), 4,5 cm
Laufmittel 2: n-Hexan:Diethylether:Essigsäure (75:23:2), 7 cm
Laufmittel 3: n-Hexan, 7 cm
(nach Klein et al. 1998)

Die Varianten 1) bis 3) brachten zum Teil eine gute Auftrennung der untersuchten Phospholipide Sphingomyelin, Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin. Cholesterol ließ sich allerdings dadurch nicht aus der Laufmittelfront abtrennen. Ein Erfolg diesbezüglich zeigte sich mit dem Protokoll nach Klein. Dieses brachte für alle 4 Substanzen eine gute Auftrennung, sodass es zur weiteren Anwendung und für die Bestimmung der Proben ausgewählt wurde. Um die Auftrennung im Bereich der Phospholipide zu optimieren, wurde in Abweichung von Klein lediglich die Laufstrecke des ersten Laufmittels auf 5 cm angehoben.

Initial war es die Absicht, alle 4 Lipidsubstanzen (Cholesterol, Sphingomyelin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin) per HPTLC zu untersuchen. Erst später stellte sich heraus, dass unter optimalen Bedingungen für die Phospholipide die quantitative Erfassung des Cholesterolgehalts nicht reproduzierbar und damit nicht aussagekräftig war. Aus diesen Gründen war Cholesterol Bestandteil der Vorversuche und vor allem hinsichtlich der Auftrennungseigenschaften der verschiedenen Laufmittel-Protokolle Beurteilungskriterium für deren Brauchbarkeit, auch wenn die Konzentrationen von Cholesterol letztendlich mit Hilfe eines Kits unabhängig von der HPTLC gemessen wurden.

3.7.3.1.2 Reproduzierbarkeit der Daten

Da bei einem ersten Messungsdurchlauf stark divergierende Werte von Doppelansätzen auffielen, wurde das Protokoll mit dem Ziel überarbeitet, Lipidverluste bei der gesamten Aufarbeitung zu minimieren und so die Daten reproduzierbar zu machen. Bis dahin war der Lipidextrakt der Folch-Extraktion nach dem Verdampfen des Lösungsmittels der unteren Phase direkt und einmalig in 10 µl Chloroform:Methanol (2:1) resuspendiert und aufgetragen worden. Dieser Schritt ging vermutlich mit einem hohen Lipidverlust einher, weil durch das geringe Resuspensionsvolumen nur ein sehr kleiner, variabler Teil der eingetrockneten Lipidsubstanz am Boden des Eppendorf-Tubes in Lösung gehen und auf die Platte aufgetragen werden konnte. Aufgrund dieser Überlegungen wurde der Resuspensionsvorgang wie oben beschrieben (modifizierte Folch-Extraktion) auf mehrere Schritte ausgedehnt und das Resuspensionsvolumen auf 50 µl erhöht.

In einem Versuchsansatz wurde der Einfluss verschiedener Resuspensionsvolumina (30 und 50 µl) auf die Unterschiede zwischen densitometrisch gemessenen Werten von Doppelansätzen untersucht. Dafür wurden fünf gespikete Proben gleichen Lipidgehalts (Mischung aus den Standardlipiden Cholesterol, Sphingomyelin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin) erstellt. Die Doppelansätze wurden der oben beschriebenen modifizierten Folch-Extraktion unterzogen und bis zur letzten Resuspension vor dem Auftragen der Einzelproben auf die Platte unaufgetrennt und gemeinsam behandelt. Bei zwei der fünf Doppelansätze lag das Resuspensionsvolumen bei 100 µl (50 µl pro Einzelprobe) und bei drei Doppelansätzen bei 60 µl (30 µl pro Einzelprobe). Erst bei der letzten Resuspension wurde entsprechend des jeweiligen Ansatzes das doppelte

Resuspensionsvolumen (60 µl bzw. 100 µl) in das 1,5 ml- Eppendorf-Tube eingegeben und das Volumen je zur Hälfte auf zwei Probenplätze pipettiert. Es zeigte sich, dass ein Resuspensionsvolumen von 50 µl im Vergleich zu einem solchen von 30 µl eine höhere Lipidausbeute erbrachte. Darüber hinaus wichen die nach Iodfärbung der Kieselgelplatten densitometrisch gemessenen Werte dieser Doppelansätze weniger stark voneinander ab (Tab. 4). Diese geringe Abweichung ergab sich allerdings nur für die Phospholipid-Substanzen. Die Werte der Cholesterolproben streuten unabhängig von den Resuspensionvolumina stark, sodass von einer densitometrischen Messung durch das beschriebene Verfahren abgesehen wurde, weil eine Reproduzierbarkeit der Werte nicht gewährleistet erschien.

Tab. 4: Densitometrisch gemessene Werte aus dem Versuch zum Einfluss des Resuspensionsvolumens auf die Reproduzierbarkeit der Messungen

Probe (Adj. Vol. in RD*mm²)	Ch (Proben 1 µg)	SM (Proben 0,5 µg)	PC (Proben 1 µg)	PE (Proben 0,9 µg)
Doppelansatz 1 (50 µl)	0,455	0,370	0,970	0,372
Doppelansatz 1 (50 µl)	0,526	0,405	1,020	0,465
Doppelansatz 2 (50 µl)	0,599	0,386	1,020	0,456
Doppelansatz 2 (50 µl)	0,620	0,391	1,000	0,436
Doppelansatz 1 (30 µl)	0,515	0,320	0,475	0,238
Doppelansatz 1 (30 µl)	0,492	0,274	0,510	0,456
Doppelansatz 2 (30 µl)	0,420	0,226	0,778	0,347
Doppelansatz 2 (30 µl)	0,394	0,275	0,715	0,300
Doppelansatz 3 (30 µl)	0,426	0,303	0,853	0,290
Doppelansatz 3 (30 µl)	0,379	0,285	0,337	0,300

Adj. Vol. = Adjusted Volume; RD = Reflection Density; Ch= Cholesterol; SM= Sphingomyelin; PC= Phosphatidylcholin; PE= Phosphatidylethanolamin

3.7.3.2 Ermittlung des Lipidgehalts der Vesikelpuben

Wie bereits erwähnt wurden für die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Lipide HPTLC-Platten verwendet. Jede Platte wurde vor Gebrauch gemäß dem Protokoll von Klein

zunächst in Methanol und nach vollständiger Abtrocknung darauffolgend in Laufmittel 1 gewaschen. Nacheinander wurden die Platten hierfür in Methanol bzw. in Laufmittel 1 bis zu einer Höhe von etwa 1 cm unter der Plattenoberkante entwickelt. Ohne diesen ausführlichen Waschschrift zeigte sich bei Durchführung des Protokolls nach der Färbung der Platte eine Bande, die sich unabhängig von den Proben etwa mittig der Platte und parallel zur Startlinie über die gesamte Platte zog und so die Auswertung der Proben unmöglich machte. Dieses Phänomen, das eventuell auf vom Laufmittel mitgeführte, platteneigene Bindemittel zurückzuführen war, konnte durch das Vorwaschen erfolgreich vermieden werden.

Vor der weiteren Verwendung wurde die Platte mit Bleistift markiert. In 1,5 cm Abstand von der Unterkante der Platte und parallel zu dieser wurde die „Startlinie“ durchgezogen. Auf dieser Höhe erfolgte später die Probenaufgabe. Um die Möglichkeit der gleichzeitigen Auswertung von 10 Proben zu gewährleisten, betrug der seitliche Abstand zur linken und rechten Plattenkante 1,2 cm, derjenige zwischen den Proben, die über eine Strichlänge von 0,4 cm aufgetragen wurden, 0,4 cm. Außerdem erfolgte eine Markierung der seitlichen Plattenkante in einem Abstand von 5 cm bzw. 7,5 cm zur Startlinie, um die jeweiligen Laufmittelstops zu kennzeichnen.

Pro Platte wurden für die Analyse der Proben 4 Proben-Plätze zum Auftrag von insgesamt 4 Standardreihen (Cholesterol, Sphingomyelin, Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin) und die verbleibenden 6 Plätze für maximal 6 Proben genutzt, sodass sich die Probenverteilung wie Tab. 5 ergab:

Tab. 5: Verteilung der Proben auf der HPTLC-Platte

Probenplatznummer	Ch	SM	PC	PE
1	0,7 µg	0,5 µg	0,75 µg	0,9 µg
2	1,0 µg	0,7 µg	1,0 µg	1,5 µg
3	2,0 µg	1,0 µg	1,5 µg	2,0 µg
4	2,5 µg	2,0 µg	2,0 µg	3,0 µg
5-10 Vesikelproben				

Ch= Cholesterol, SM = Sphingomyelin; PC= Phosphatidylcholin; PE= Phosphatidylethanolamin

3.7.3.2.1 Probenaufgabe und HPTLC

Die extrahierten und resuspendierten Lipidproben wurden mittels einer 5 µl-Hamilton-Nadel auf einer Länge von etwa 0,4 cm entlang der Startlinie aufgetragen. Pro Auftragevorgang wurde 0,5-1 µl Probe vorsichtig von links nach rechts strichförmig über die Probenplatz-Länge verteilt, während der Rest der Resuspension auf Eis gehalten wurde, um vorzeitiges Verdampfen des Lösungsmittels zu minimieren. Danach erfolgte vor erneuter Probenaufgabe eine kurze Trocknungsphase, welche mittels warmer Fönluft beschleunigt wurde. Nach Eintrocknen wurde der Vorgang so lange wiederholt bis die gesamte Probenmenge aufgetragen war. Die erfolgreiche Probeaufgabe wurde nach Abschluss per UV-Licht kontrolliert. Für die Vorbereitung der Laufgefäße, die schon während der Aufbereitung der Proben stattfand, wurden je etwa 25 ml Laufmittel in ihrer jeweiligen Zusammensetzung (siehe 3.7.3.1.1) angemischt und in ein Glasgefäß gegeben, sodass sich der Laufmittelspiegel in etwa 1 cm Höhe über dem Boden befand. Das Glasgefäß wurde hermetisch verschlossen und für mindestens 1 h belassen, damit sich die Luft über der Flüssigkeit mit Laufmitteldämpfen sättigen konnte.

Sobald die Platte vollständig beladen und abgetrocknet war, wurde diese in das mit Laufmittel gefüllte, vorbereitete Glasgefäß gestellt, um den Lauf zu starten. Dabei war darauf zu achten, dass der Flüssigkeitspegel des Laufmittels kurz unterhalb der Startlinie und parallel zu dieser zu liegen kam, um einen gleichmäßigen Lauf aller Substanzen zu gewährleisten.

Sobald die gewünschte Laufhöhe erreicht war, wurde die Platte aus dem Glasgefäß entnommen und durch warme Fönluft getrocknet. Je nach Protokoll folgte darauf ein weiterer Lauf oder die Färbung der Platte in Iod-Dämpfen.

3.7.3.2.2 Detektion der Proben

Da sich in Vorversuchen herausstellte, dass die Detektion mit Iod sensitiver war als diejenige mittels CuSO₄, ergab sich hier eine Abweichung von dem genutzten Protokoll (Klein et al. 1998).

Für die Färbung der Platte wurde eine gehäufte Spatelspitze doppelt sublimiertes Iod in ein 100 ml-Becherglas gegeben. Dieses wiederum wurde in einem 1 l- Becherglas platziert, welches durch Auflegen eines Porzellan-Tellers verschlossen wurde. Dieser Ansatz wurde für

mindestens 24 h bei Raumtemperatur unter dem Abzug belassen, damit sich die Iod-Dämpfe im Glas anreichern konnten. Zur Färbung wurde die jeweilige Platte für eine Dauer von 40 Minuten in die vorbereitete Apparatur hineingestellt. Anschließend wurde die Intensität der angefärbten Banden per Densitometer ausgewertet.

Die densitometrische Messung der Proben erfolgte nach Abgleich der Retentionsfaktoren (siehe 3.7.3.3) mittels des Densitometers GS-800TM von BioRad (BioRad Laboratories GmbH, München) und der Analyse-Software Quantity One (BioRad Laboratories GmbH, München). Die jeweilige Probenplatte wurde eingescannt und die Banden mittels Freihandtool umrissen, um deren Intensität per Software messen zu können.

3.7.3.3 Statistische Auswertung der HPTLC

Die gefärbten HPTLC-Platten wurden zunächst deskriptiv ausgewertet. Für die Standardlipid-Spots sowie für die Banden der Vesikelproben wurden die Retentionsfaktoren (R_f -Werte), also die Quotienten aus der Laufstrecke der Substanz (cm) und der Laufstrecke des Fließmittels (cm) ausgehend vom Startpunkt, berechnet und verglichen. Als Messhilfsmittel diente ein Lineal mit cm-Angaben. Übereinstimmende Retentionsfaktoren der Banden der Standard- und der unbekannten Proben dienten als Hinweis auf eine wahrscheinliche Übereinstimmung der im Spot angefärbten Substanz. Mit Hilfe dieses Verfahrens wurden die Banden der untersuchten Phospholipide (Sphingomyelin, Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin) in den Vesikelproben ermittelt und im Anschluss densitometrisch gemessen.

Aus den gemessenen Werten der Standardproben wurden mit Hilfe des Programmes Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation) Standardkurven für die Phospholipide Sphingomyelin, Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin ermittelt. Anhand der ermittelten linearen Gleichungen ließen sich Schätzwerte für die Lipidgehalte der unbekannten Proben berechnen. Diese wurden zum Vesikelproteingehalt der aufgetragenen Probe in Beziehung gesetzt.

3.7.3.4 Bestimmung des Cholesterolgehalts der Vesikelproben mittels Detektionskit

Wie bereits oben beschrieben wurde der Cholesterol-Gehalt der Proben aufgrund der fehlenden Reproduktivität in der HPTLC-Analyse mit Hilfe eines kommerziellen,

enzymatischen Kits bestimmt (EnzyChrom™ Cholesterol Assay Kit ECCH-100, Bio Assay Systems, Biotrend Chemikalien GmbH, Köln). Das Prinzip des Kits war folgendes: Durch Einsatz des Enzyms Cholesterol-Esterase, das auf vorhandene Cholesterolster in der Probe einwirkte, wurde freies Cholesterol gebildet. Dieses wurde nachfolgend mittels Cholesterol-Dehydrogenase zu Cholest-4-en-3-on konvertiert, wobei das Koenzym NAD (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) zu NADH reduziert wurde. Die optische Dichte von NADH wurde bei 340 nm gemessen und war direkt proportional zur Cholesterolkonzentration in der Probe, weshalb sie als Parameter zu dessen Schätzung genutzt werden konnte.

Das Vorgehen bei der Messung erfolgte nach dem von der Herstellerfirma mitgelieferten Protokoll.

Alle im folgenden Abschnitt erwähnten Reagenzien entstammten dem Kit. Zunächst wurde aus 40 µl der Cholesterol-Standardlösung (300 mg/dl) und 360 µl „Assay Buffer“ eine Stocklösung angesetzt. Daraus wurde eine Standardreihe, bestehend aus 8 Standardproben, hergestellt. Die Proben wurden 10-fach verdünnt. In eine 96-Well-Platte wurden nun im Doppelansatz je 50 µl der vorbereiteten Standards bzw. der Proben pipettiert, wobei Doppelansätze der Proben in Abhängigkeit von der vorhandenen Menge an Probenmaterial angesetzt wurden. Eine Mischung aus 40 µl „Assay Buffer“ und 18 µl NAD wurde gleich darauf pro Well vorbereitet und je 50 µl von dieser Lösung pro Well eingegeben. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die optische Dichte als Nullwert „OD₀“ mit Hilfe des automatischen Plattenlesers (iEMS Reader MF, Typ 1401, MTX Lab Systems Inc., Virginia, USA) bei 340 nm gemessen.

Daraufhin wurde die Enzymlösung angesetzt. Pro Well wurden 10 µl „Assay Buffer“ und 1 µl Cholesterol-Esterase-Lösung vorbereitet und zu jedem Ansatz 10 µl dieser Mischung zugegeben. Nach erneuter 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde wiederum die optische Dichte gemessen („OD₃₀“).

3.7.3.5 Statistische Auswertung der Messung des Cholesterolgehalts mittels Detektionskit

Aus den Doppelansätzen wurden die arithmetischen Mittelwerte für die jeweiligen Proben berechnet, sodass daraufhin für jeden Wert die Differenz zwischen den Werten OD₃₀ und OD₀ ($\Delta OD = OD_{30} - OD_0$) berechnet werden konnte.

Aus den Werten der Standards wurde durch lineare Regression mit Hilfe des Programmes Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation) eine Standardkurve ermittelt, die zur Bestimmung der Gehalte der Vesikelproben diente.

3.8 Untersuchung der vesikulären Wirkung auf Tiefgefriersperma

3.8.1 Studiendesign und Zielsetzung

Teil 1 des Versuches beschäftigte sich mit der Frage, ob Vesikel generell einen Einfluss auf die gemessenen Eigenschaften der Spermien haben, wobei das Augenmerk vor allem auf den Motilitätsparametern der Spermien lag.

Für diese Untersuchung wurden drei Gruppen gebildet:

- 1) Spermien, die ohne Vesikel eingefroren wurden
- 2) Spermien, die mit Vesikeln (0,04 mg Vesikelprotein/ml) eingefroren wurden
- 3) Spermien, die zunächst ohne Vesikel eingefroren wurden, aber die direkt nach dem Auftauen mit Vesikeln (0,04 mg Vesikelprotein/ml) versetzt wurden

Die Vesikelkonzentration bezog sich jeweils auf das mittels BCA-Kit in der Vesikelprobe gemessene Protein, das hier als Messgröße für die Vesikelmenge - analog zu den Studien aus dem Humanbereich - herangezogen wurde. Die Konzentration von 0,04 mg/ml für diesen Versuchsansatz wurde gewählt, weil es die höchstmögliche Konzentration war, die hinsichtlich des Vesikelertrages aus der dritten Fraktion von jedem einzelnen Probanden erreicht werden konnte.

Da diese Konzentration unter der in der Literatur erwähnten optimalen Wirkungskonzentration lag, schloss sich ein zweiter Studienteil an, worin eine eventuell konzentrationsabhängige Wirkung der Vesikel untersucht wurde. Es wurden ausschließlich Proben untersucht, bei welchen die Vesikelzugabe nach dem Auftauen erfolgte (ähnlich Gruppe 3 aus Studienteil 1). Dies ermöglichte eine Reduktion des untersuchten Spermiovolumens und damit eine Erhöhung der Vesikelkonzentration in der Probe.

Für Teil 2 der Studie wurden ebenfalls drei verschiedene Gruppen erstellt. Alle Proben wurden für diesen Versuchsteil zunächst ohne Vesikel tiefgefroren. Die Vesikelzugabe in

unterschiedlicher Menge (gemessen in mg Vesikelprotein) erfolgte erst nach dem Auftauen, sodass sich folgende drei Gruppen ergaben:

- 1) Spermien mit Vesikelzugabe nach dem Auftauen (0,05 mg Vesikelprotein/ml)
- 2) Spermien mit Vesikelzugabe nach dem Auftauen (0,1 mg Vesikelprotein/ml)
- 3) Spermien mit Vesikelzugabe nach dem Auftauen (0,2 mg Vesikelprotein/ml)

Die Studie (Teil 1 und 2) umfasste 10 Rüden. Von jedem Rüden wurde ein Ejakulat verwendet, das wie unten beschrieben aufbereitet und tiefgefroren wurde. Rüde 1 wurde für den Versuch zweimalig abgesamt und die einzelnen Fraktionen wurden gepoolt. Eingefroren wurden pro Proband je sechs 0,5 ml-Pailletten (Midi-Pailletten, Minitüb GmbH, Tiefenbach) mit Aliquots der Spermienproben ohne Vesikelzusatz und je zwei 0,5 ml-Pailletten mit Vesikelzusatz. Aus diesem Probenmaterial erfolgten die Untersuchungen für beide Versuchsteile, wobei für jede der insgesamt sechs Gruppen je ein Aliquot pro Hund untersucht wurde.

Die Samengewinnung und Spermauntersuchung der spermienreichen Fraktion erfolgte wie in Kapitel 3.2 bzw. 3.3 beschrieben. Abweichend von der Beschreibung wurde die Pathomorphologie an Spermac®-gefärbten Ausstrichen der spermienreichen Fraktion (Spermac® Stain, Minitüb GmbH, Tiefenbach) durchgeführt. In Ergänzung erfolgte außerdem ein hypoosmotischer Schwelltest (HOS-Test) und die computergestützte Messung der Spermienmotilitätsparameter am Nativejakulat. (CASA mittels SpermVision™-System, Minitüb GmbH, Tiefenbach).

Während die spermienreiche Fraktion des Ejakulats (Fraktion 2) zur Gewinnung von motilen Spermien einer Dichtegradientenzentrifugation unterzogen wurde, diente die dritte Fraktion (Prostatasekret) der Gewinnung von Vesikeln und wurde nach oben beschriebenem Protokoll aufgereinigt.

3.8.2 Dichtegradientenzentrifugation

Um aus der zweiten, spermienreichen Fraktion des Ejakulats eine Probe aus motilen Spermien ohne Vesikelbeimengung zu isolieren, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Diese erfolgte mit Hilfe des Mediums SpermFilter® (Gynemed GmbH & Co.KG, Lensahn). In diesem Medium, dessen Grundlage eine isotonische HEPES(2-(4-(2-

Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)-/Phosphat-Pufferlösung war, lagen Silan-beschichtete Silikartikel in Lösung vor, mit deren Hilfe die Komponenten des Ejakulats nach Dichteigenschaften aufgetrennt wurden. Da sich motile Spermien in dieser Hinsicht von immotilen Spermien sowie von den Bestandteilen des Seminalplasmas einschließlich der Vesikel unterschieden, konnten sie durch dieses Verfahren abgetrennt werden.

In Vorversuchen zeigte sich, dass bei einer alleinigen Verdünnung des 100%igen Mediums mit PBS (Phosphate buffered saline; englisch für phosphatgepufferte Salzlösung) die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien nach Kontakt mit dem SpermFilter®-Medium stark herabgesetzt war. Nach dem darauffolgenden Tiefgefrier- und Auftauprozess waren im Lichtmikroskop bis zu 100% der Spermien des untersuchten Aliquotes immotil.

Die Beobachtung, dass das Tiefgefrierverfahren unter denselben Bedingungen ohne vorherige Dichtegradientenzentrifugation akzeptable Ergebnisse der Vorwärtsbeweglichkeit (etwa 40-50%) nach dem Auftauen erbrachte, führte zu der Annahme, dass die hohe Immotilität auf eine Interaktion der Spermien mit dem Silikatmedium zurückzuführen sein könnte. Deshalb erfolgte ein Versuchsansatz mit PBS-Puffer und BSA (6%) als Verdünnungsmedium, was sich als effektiv herausstellte und deshalb in der darauffolgenden Studie als Verdünnungslösung in dieser Zusammensetzung verwendet wurde.

Pro Ejakulat wurden zwei Ansätze in zwei getrennten, konischen BD-FalconTM-Tubes (15 ml) angefertigt. Zur Vereinheitlichung der beiden Versuchsansätze wurden nach Dichtemessung jeweils 200 Millionen Spermien unverdünnt aus der spermienreichen Fraktion als Probe aufgetragen. Alle Lösungen wurden vor Einsatz auf 37 °C im Wasserbad (Typ WNB 45, Memmert GmbH u. Co KG, Schwabach) erwärmt, um die Bedingungen für die Spermien möglichst optimal zu halten.

Der Gradient wurde folgendermaßen erstellt: Zunächst wurde das 100%ige Medium in den beiden BD-FalconTM-Tubes (15 ml) auf 40% bzw. 80% verdünnt. Als Verdünnungsmedium diente eine Lösung aus PBS-Puffer (Rezeptur siehe Anhang) und 6% BSA (Bovines Serum Albumin), die kurz vor Gebrauch frisch angesetzt wurde. Für 2 ml 40%ige bzw. 80%ige Lösung wurden 0,8 ml bzw. 1,6 ml 100%ige Lösung mit 1,2 ml bzw. 0,4 ml PBS-Puffer und 6% BSA -Lösung gemischt. Daraufhin wurden 2 ml 80%ige Lösung in ein drittes, leeres BD-FalconTM-Tube pipettiert und mit 2 ml 40%iger Lösung vorsichtig überschichtet. Eine Vermischung der Phasen war zu vermeiden. Die Überschichtung des 80%igen Mediums durch das 40%ige wurde in dem BD-FalconTM-Tube, das die restliche Menge an 80%igem

Medium beinhaltet, wiederholt. Es folgte die Probenaufgabe (200 Millionen Spermien mit einem maximalen Probenvolumen von 1 ml) auf den Gradienten und eine anschließende Zentrifugation bei 300 g für 20 Minuten (Rotina 38, Rotor 1794, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen) bei ausgeschalteter Bremsaktivität der Zentrifuge. Wie auf Abb. 3 zu sehen, trennte sich die Spermienprobe abhängig von der Dichte der Komponenten in einzelne Fraktionen auf. Die Flüssigkeit über dem Pellet am Boden des BD-FalconTM-Tubes, wo sich die lebenden Spermien befanden, wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Das gewonnene Pellet wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und es folgten Waschungen bei 300 g für je zweimal 10 Minuten und zweimal 5 Minuten in jeweils 2,5 ml PBS-Puffer mit 6% BSA. Dieser Ansatz wurde dann erneut zentrifugiert (500 g, 10 Minuten, Rotina 38, Rotor 1794, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen) und das Pellet in ein neues Zentrifugenglasröhrchen mit Spitzboden (DURAN®, Schott, Mainz) überführt. Das aus diesem Waschschrift resultierende Pellet war Ausgangsmaterial für die nachfolgende Kryokonservierung.

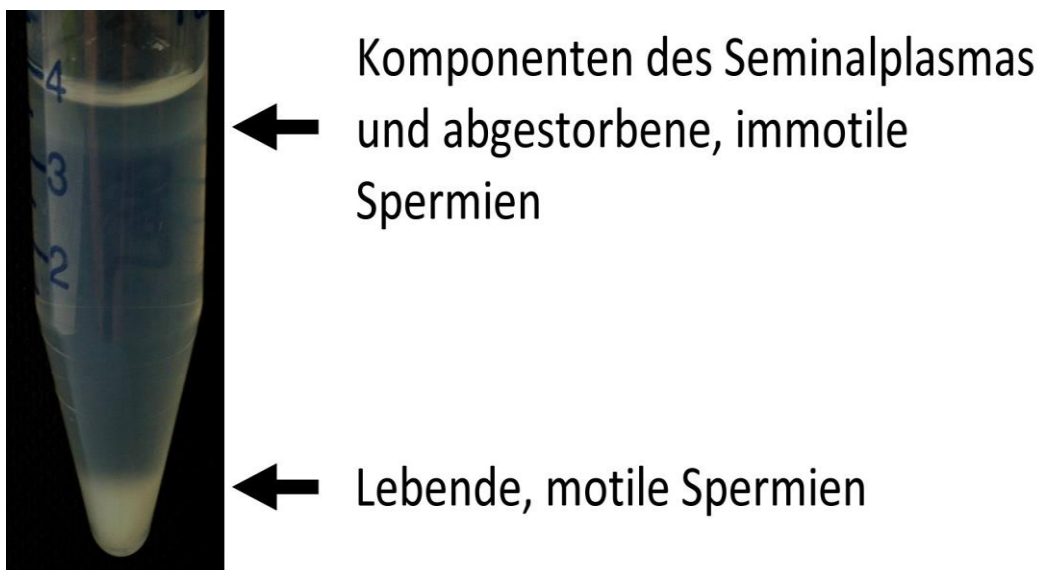


Abb. 3: Auftrennung der spermienreichen Fraktion nach der Dichtegradientenzentrifugation mit SpermFilter® (SpermFilter®, Gynemed GmbH & Co.KG, Lensahn).

Kurz unterhalb der Oberfläche ist ein trüber Ring zu sehen, der verschiedene Seminalplasmakomponenten sowie abgestorbene und immotile Spermienzellen beinhaltet.

Am Boden des 15 ml-BD-FalconTM-Tubes befinden sich die lebenden Spermien.

3.8.3 Kryokonservierung des Spermas

Die Kryokonservierung der Spermienproben geschah mit Hilfe des nicht-kommerziellen, zwei-phasigen Verdünnersystems Uppsala-Equex 2 (Rezeptur siehe Anhang, nach Linde-Forsberg 2001). Die Verdünner wurden in ausreichender Menge vor Beginn der Studie angesetzt und bis zum Gebrauch in verschlossenen 2 ml- Plastikspritzen bei -21 °C gelagert, um sie bei Bedarf auftauen zu können. Während Verdünner 1 auf einem Wärmetisch (Typ H T 200 Minitüb GmbH, Tiefenbach) bei 37°C erwärmt wurde, erfolgte der Auftauvorgang des zweiten Verdünners stets im Kühlschrank bei 4°C.

Die Spermienkonzentration des aus der Dichtegradientenzentrifugation erhaltenen Pellets wurde direkt nach dem letzten Waschschrift erneut gemessen und das Pellet zur Kryokonservierung entsprechend mit dem Verdünner 1 des Uppsala Equex-2 Systems verdünnt. Das benötigte Volumen des ersten Verdünners betrug die Hälfte des Volumens, das abzüglich des Pelletvolumens für eine Verdünnung der Spermienprobe auf eine Endkonzentration von 100 Millionen Spermien/ml nötig war. Anschließend wurde die Probe bei 4° C für 24 h im Kühlschrank innerhalb einer Styroporbox gelagert. Diese sehr lange Lagerungsdauer der Spermienproben in der ersten Verdünnerlösung, die die normalerweise vorgesehene Äquilibrierungszeit von etwa einer Stunde überschritt, wurde gewählt, um Zeit für die Vesikelaufreinigung zu gewinnen. Studien von Hermansson et al. (2006) zufolge war dies ohne negative Auswirkungen auf die Spermienmotilität möglich.

Nach 24 h wurde beiden Ansätzen dasselbe Volumen des zweiten Verdünners des Uppsala Equex-2 Systems (4° C) zugefügt, das vorher von dem ersten Verdünner eingesetzt worden war. Das Glasröhrchen mit der Probe wurde vorsichtig um seine Längsachse gedreht, während das Medium dabei tropfenweise an der Wand des Reaktionsgefäßes entlang in die Probe lief. Dann wurde die Probe vorsichtig geschwenkt, um eine gleichmäßige Vermischung der Spermien mit dem Verdünnersystem zu erhalten. Aus einem der beiden Ansätze wurde 1 ml der verdünnten Spermienprobe entnommen. Diesem Aliquot wurden Vesikel zugesetzt, sodass die Vesikel-Proteinkonzentration 0,04 mg/ml betrug. Vesikel und Spermienproben stammten stets von demselben Rüden, d.h. es wurden den Spermienproben eines Individuums keine „körperfremden“ Vesikel zugefügt. Der restliche Anteil der verdünnten Spermienproben blieb unverändert und damit vesikelfrei. Im Anschluss wurden je etwa 0,5 ml Aliquots der Proben in zuvor beschriftete Midi-Pailletten aufgezogen und verschlossen. Dies ergab zwei Pailletten mit vesikelhaltigen Spermienproben und sechs Pailletten, die

vesikelfreie Samenproben beinhalteten. Alle diese Vorgänge geschahen auf einem Kühlakku bei etwa 4°C.

Der Einfriervorgang erfolgte schrittweise: Eine Styroporbox wurde bis zu einer Höhe von etwa 5 cm mit flüssigem Stickstoff gefüllt. Die Pailletten (4°C) wurden auf einem Schwimrack gelagert und dieses wurde daraufhin in den Styroporbehälter verbracht. Dies hatte eine Absenkung der Temperatur auf etwa -120°C zur Folge. Nach 20 Minuten wurden die Pailletten direkt in den flüssigen Stickstoff (-196° C) geworfen. Kurze Zeit später erfolgte das Einsortieren der Pailletten in die Goblets bzw. in die mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tiefgefriercontainer.

Das Auftauen der Pailletten erfolgte bei Untersuchungsbeginn jeweils einzeln bei 37°C für 1 Minute im Wasserbad (Typ WNB 45, Memmert GmbH u. Co KG, Schwabach). Die Pailletten wurden sorgfältig abgetrocknet und dann in ein auf 37 °C vorgeheiztes (Typ H T 300W Microscope Stage, Minitüb GmbH, Tiefenbach), beschriftetes 1,5 ml-Eppendorff-Tube entleert. Falls für die jeweilige Untersuchungsgruppe vorgesehen (siehe 3.8.1), erfolgte nun auch direkt der Zusatz einer entsprechenden Menge an Vesikeln zu den verdünnten, bis dahin vesikelfreien Spermienproben. Sobald die Probe in ihrer vollständigen Zusammensetzung im Eppendorf-Tube vorlag, wurde mit der Messung der Parameter begonnen. Während für Teil 1 des Versuches zur Erstellung der Gruppe 3 der gesamte Inhalt einer 0,5 ml-Paillette vesikelfreier Spermien genutzt wurde, um diesem nach dem Auftauen Vesikel zuzufügen, wurde für Teil 2 des Versuches aufgrund der begrenzt vorhandenen Vesikelmengen nur ein Teil der vesikelfreien Spermienprobe einer Paillette genutzt. Für Gruppe 1 aus Teil 2 kamen 40 µl Spermienprobe zum Einsatz, für Gruppe 2 und 3 jeweils 20 µl. Diese Aliquots wurden jeweils mit der nötigen Menge an Vesikeln gemischt, um die im Studiendesign festgelegten Vesikelkonzentrationen in den Proben zu erreichen.

3.8.4 Spermatologische Untersuchung

Für Teil 1 der Studie wurden Messungen zu den Zeitpunkten 0, 10 und 30 Minuten nach dem Auftauen der Proben durchgeführt. 0 und 30 Minuten nach dem Auftauen erfolgte jeweils eine umfangreiche, spermatologische Untersuchung. Sie beinhaltete die lichtmikroskopische Schätzung der Vorwärtsbeweglichkeit im positiven Phasenkontrast, die Messung der Motilitätsparameter mittels CASA (Computer-assisted sperm analysis mittels SpermVisionTM -

System, Minitüb GmbH, Tiefenbach), die Anfertigung eines Eosin-Ausstriches zur Auswertung des Lebend-/Totverhältnisses, den HOS-Test (Hypoosmotischer Schwelltest), und die Ermittlung pathomorphologischer Daten am Spermac®-gefärbten Ausstrich. Zum Zeitpunkt 10 Minuten nach dem Auftauchen wurde lediglich die Vorwärtsbeweglichkeit im Lichtmikroskop geschätzt und erneut die Motilitätsparameter mittels CASA erfasst.

Für Teil 2 der Studie wurde aufgrund der geringen Probenmenge auf die Anfertigung von Eosin- und Spermac®-gefärbten Ausstrichen sowie auf die Durchführung des HOS-Tests verzichtet. Ansonsten geschahen die Messungen analog zu denjenigen des ersten Teils der Studie.

3.8.4.1 Objektive Erfassung der Motilitätsparameter der Spermien mittels CASA

Die Computer-gestützte Spermienanalyse (Computer-assisted sperm analysis, CASA) ermöglichte die objektive Schätzung verschiedener Motilitätsparameter der Spermien (CASA-Gesamtmotilität, CASA-Vorwärtsbeweglichkeit, VAP, VCL, VSL, DAP, DCL, DSL, LIN, STR, WOB, ALH, BCF). Hierfür wurde das Computerprogramm SpermVision™ (Version 3.5.6.2.-Juli 2009, Minitüb GmbH, Tiefenbach) verwendet.

Darüber hinaus kam folgende Hardware zum Einsatz: Ein Mikroskop mit negativem Phasenkontrast (Mikroskop Olympus BX41TF, Negativ-Hochkontrast-Objektiv UPlan FINH, 20x/0,50 Ph1, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) und automatisch beweglichem Objektstisch (ScanStage, beheizbar), eine Hochgeschwindigkeits-Schwarz/Weiß-Digitalkamera (Auflösung: 60 Frames/Sekunde), die die Verbindung zwischen Mikroskop und Rechner ermöglichte, und ein Computer (Intel Pentium® 4D-Dual Core-mit 3.0 GHz Prozessor und Betriebssystem Microsoft Windows XP Professional, Vista comp. Grafikkarte, 19" TFT-Monitor).

Die Einstellung der Untersuchungspositionen geschah automatisch. Eine Messung in Randbereichen und im Bereich des oberen bzw. unteren Kammerendes wurde vermieden. Zur Erkennung der Spermien durch den Computer wurden Partikel mit der Fläche 20- 60 μm^2 als Spermien definiert. Beurteilt wurden pro Gesichtsfeld innerhalb einer Zeitdauer von 0,5 Sekunden 30 nacheinander aufgenommene Bilder und mindestens 4000 Spermien pro Probe. Die Software ermittelte aus den gewonnenen Daten die Motilitätsparameter und gab sie in Form von Mittelwerten (je ein Mittelwert pro gemessenem Gesichtsfeld und ein

Mittelwert aller der Werte aller Gesichtsfelder) wieder. Detaillierte Angaben zu den Einstellungen sind dem Anhang zu entnehmen.

Eine vorgefertigte Kammer (4-kammriger Objekträger mit Standardtiefe 20 µm, Leja Standard Count 4 Chamber, Leja Products, B.V., Nieuw Vennepe, Niederlande) wurde auf dem Objekttisch des Mikroskops platziert und ein Aliquot (etwa 3,5 µl) der zu untersuchenden Spermienprobe wurde aus einer Pipette luftblasenfrei durch die Kapillarkräfte in die Kammer aufgesogen. Die Probenaufgabe wurde beendet, sobald die Kammer vollständig mit Probe gefüllt war. Infolge von Luftblasen sowie zu niedrigem oder zu hohem Probenvolumen nicht auswertbare Kammern wurden sofort ausgeschlossen. Wichtig waren darüber hinaus die Kontrolle der Bildschärfe und die Einstellung optimaler Lichtverhältnisse. Die Messung wurde direkt nach Probenaufgabe per Computerbefehl gestartet und bei 200-facher Vergrößerung durchgeführt.

3.8.4.2 Pathomorphologie (Spermac®-gefärbten Spermienausstrich)

Für die Färbung mit den Färbelösungen des Spermac®-Sets (Spermac® Stain, Minitüb GmbH, Tiefenbach) wurden etwa 5 µl der spermienreichen Fraktion an die obere Kante eines Objekträgers pipettiert und die Probe gleich darauf mit einem weiteren sauberen Objekträger ausgestrichen. Nach Abtrocknen des Ausstriches an der Luft wurde der Objekträger für 5-10 Minuten in eine Fixierlösung gestellt. Anschließend erfolgte eine erste Färbung für 2 Minuten in Färbelösung A (rot) des Kits. Es schloss sich ein Waschvorgang in Leitungswasser an. Daraufhin wurde der Objekträger für 1 Minute in Färbelösung B (hellgrün) belassen, um nach einem weiteren Waschvorgang den letzten Färbeschritt mit Färbelösung C (dunkelgrün) durchzuführen. Der fertig gefärbte Objekträger wurde erneut gewaschen. Sobald er trocken war, wurde er bei 1000-facher Vergrößerung mit Ölimmersion (Mikroskop Hund H 500, Objektiv 100x, Okular WF, 10x Helmut Hund GmbH, Wetzlar) ausgewertet. Hierfür wurden 200 Spermien ausgezählt und eventuell vorhandene pathomorphologische Veränderungen zahlenmäßig festgehalten. Zur Auswertung diente eine elektronische Zählmaschine (Assistent Counter 345/15, Typ AC-15 PC; Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim). Es wurden alle morphologisch sichtbaren Veränderungen erfasst und zahlenmäßig für die Auswertung folgenden sechs Bereichen zugeordnet: Morphologisch

unauffällige Spermien, Spermien mit losen Köpfen, mit Kopf-, Akrosom- und, Geißeldefekten sowie Zytoplasmatropfen.

3.8.4.3 HOS-Test

Für den HOS-Test wurde zunächst eine Lösung aus Natriumcitrat, Fructose und destilliertem Wasser (Rezeptur siehe Anhang) hergestellt (Riesenbeck et al. 2001). Ziel war es, den Anteil membranintakter Spermien bzw. Spermien mit geschädigter Zellmembran zu ermitteln. Einteilungskriterium hierfür war die Veränderung des Spermienchwanzes (Jeyendran et al. 1992; Riesenbeck et al. 2001). Aufgerollte Schwänze („curled“) zeigten dabei eine erhaltene Membranintegrität an. Spermien, deren Schwänze trotz Inkubation in der Untersuchungslösung geradlinig blieben („non-curled“) oder sich um den Spermienkopf wickelten, wurden als membrangeschädigt gewertet.

Vor Versuchsbeginn wurde die erforderliche Menge an Natriumcitrat-Fructose-Lösung angesetzt und je 100 µl dieser Lösung wurden in vorbereitete 1,5 ml Eppendorf-Tubes pipettiert und bei -25°C eingefroren. Die jeweils benötigte Anzahl der Test-Tubes wurde dann bei Bedarf kurz vor Gebrauch aufgetaut. Zur Durchführung des Tests wurden 10 µl Probe zu 100 µl Testlösung hinzugefügt und der Ansatz für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Ein Aliquot von 10 µl wurde nach Ablauf der Inkubationszeit auf einem Objektträger mit Deckglas bei 400-facher Vergrößerung mittels Lichtmikroskop im positiven Phasenkontrast untersucht (Mikroskop Hund H 500, Objektiv 40x/0,65, Okular WF 10x, Helmut Hund GmbH, Wetzlar). Zur Schätzung wurden insgesamt 200 Spermien ausgezählt und den Gruppen „non-curled“ und „curled“ wie oben beschrieben zugeordnet.

3.8.5 Statistische Auswertung

Die Daten aus beiden Studienteilen wurden mit Hilfe des Programmes Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation) tabellarisch erfasst und zur weiteren statistischen Auswertung an die Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen gegeben. Dort erfolgte eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich der beiden Variablen Behandlung und Zeit mit Hilfe der Programme BMDP1D (einfache Datenbeschreibung) und BMDP2V (zweifaktorielle Varianzanalysen mit Messwiederholungen) des

Statistikprogrammpaketes BMDP/Dynamic, Release 8.1 (Dixon 1993; BMDP Statistical Software Inc.).

Darüber hinaus wurde für die Parameter „Anteil lose Spermienköpfe“, „Anteil Geißeldefekte“, „Anteil Kopfdefekte“, „Anteil Zytoplasmatropfen“ und „Anteil Akrosomdefekten“ (seltene Zählergebnisse) eine Poisson-Regression mit anschließendem Wald-Test (Statistiksoftware R (Free Software Foundation's GNU project, offizielle Homepage: <http://www.r-project.org>) durchgeführt. Für den „Anteil Kopfdefekte“ kam zusätzlich der exakte Fischartest (Cytel Studio StatXact Vers. 9.0.0; 2010; Cytel Inc., Cambridge, MA 02139, U.S.A.) zum Einsatz.

Die normalverteilten Parameter (CASA-Gesamtmotilität, DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, ALH, BCF, HOS-Test (Spermien mit Merkmal „curled“), lebende Spermien (Eosin-Ausstrich), morphologisch unauffällige Spermien) sowie die Parameter „Anteil lose Spermienköpfe“, „Anteil Geißeldefekte“, „Anteil Kopfdefekte“, „Anteil Zytoplasmatropfen“ und „Anteil Akrosomdefekten“ wurden durch die Kenngrößen arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung ($\bar{x} \pm SD$) sowie durch die Extremwerte (Minimum bzw. Maximum; Min. bzw. Max.) dargestellt. Die nicht-normalverteilten Parameter (Progressive Motilität mittels CASA und subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit) wurden zur Auswertung einer Wurzeltransformation unterzogen. Zur Darstellung diente nach Rücktransformation der Werte der „modifizierte Mittelwert“ und der „modifizierte 1-s- Bereich“ sowie die Extremwerte (Minimum bzw. Maximum: Min. bzw. Max.).

Die Erstellung der graphischen Abbildungen erfolgte mit Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation).

Ergebnisse galten bei $p \leq 0,05$ (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$) als statistisch signifikant.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Lichtmikroskopie

Insgesamt wurden Ejakulate von 35 zufällig ausgewählten Rüden (Altersverteilung: $4,23 \pm 2,25$ Jahre, Gewichtsverteilung: $32,2 \pm 16,1$ kg) 21 unterschiedlicher Rassen jeweils mindestens einmalig lichtmikroskopisch untersucht. Eine Übersicht der Rüden findet sich im Anhang. Alle untersuchten Proben enthielten Vesikel. Unter den Probanden waren 31 fertile Rüden sowie drei Rüden, die bei der spermatologischen Untersuchung eine Abweichung von der Norm aufwiesen, und ein Kastrat (Rüde 35).

Bei den Rüden 17 und 32, die eine Hypokinozoospermie aufwiesen, waren im Vergleich mit fertilen Rüden lichtmikroskopisch subjektiv keine Abweichungen im Hinblick auf die Vesikelzahl oder deren Morphologie festzustellen. Ein dritter Rüde (Rüde 33) mit einer stark erhöhten Anzahl an Spermien mit Zytoplasmotropfen zeigte jedoch auffällig wenig vesikuläre Strukturen in allen Fraktionen des Ejakulats. Bei dem kastrierten Probanden konnten im Lichtmikroskop lediglich sehr kleine Vesikel nachgewiesen werden.

Bei Rüde 1 und 2 erfolgte die Probennahme mehrfach in unterschiedlichen Abständen. Bei wiederholter Probennahme an aufeinanderfolgenden Tagen fiel lichtmikroskopisch eine Reduktion der Vesikelmenge und der Vesikelgröße im Ejakulat auf.

Während sich in der spermienreichen Fraktion (Fraktion 2) bei fertilen Rüden stets zahlreiche vesikuläre Partikel befanden, beinhaltete die dritte Ejakulatsfraktion nur wenige und die erste Fraktion fast keine derartigen Strukturen (siehe Abb. 4-6). Die Vesikel fanden sich im lichtmikroskopischen Bild frei beweglich meist in Gruppen, aber zum Teil auch einzeln zwischen den Spermien. Anzeichen für eine direkte Interaktion zwischen Spermien und Vesikeln waren nicht festzustellen (Abb. 4).

Allgemein war die Vesikelpopulation sehr heterogen. Dies ermöglichte zum Teil schon auf lichtmikroskopischer Ebene Unterscheidungen einzelner Typen anhand der Größe sowie anhand des vesikulären Inhaltes. Abb. 5 zeigt zum einen sehr große Vesikel, die weitgehend leer erscheinen, marginal aber meist eine Ansammlung von lichtundurchlässigem Material granulärer Struktur aufweisen. Zum anderen finden sich mittelgroße bis kleine Vesikel mit dichtem Inhalt sowie sehr kleine Vesikel, deren Inhalt lichtmikroskopisch nicht genauer definierbar war. Die Messung der Durchmesser der optisch größten bzw. kleinsten Vesikel im

Bereich eines zufällig ausgewählten Gesichtsfeldes bei 400-facher Vergrößerung ergab Werte im Bereich von 0,65 μm bis 3,8 μm .

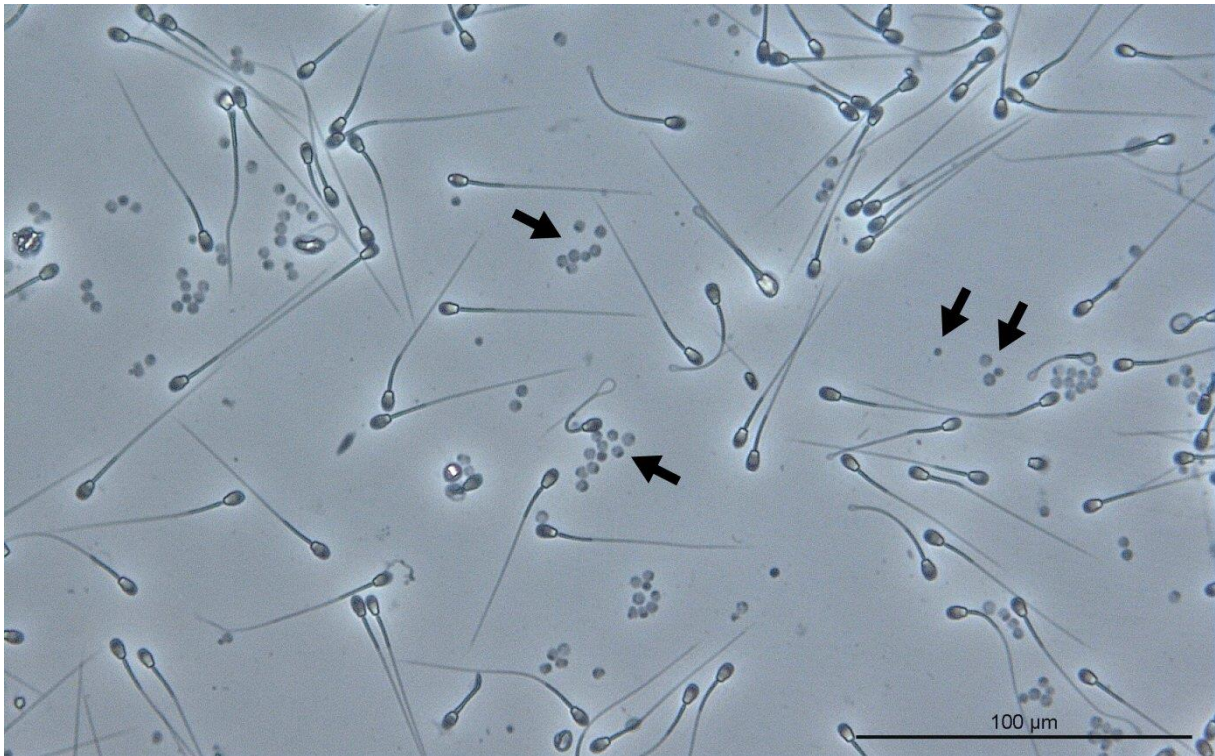


Abb. 4: Lichtmikroskopische Aufnahme (200-fache Vergrößerung) der spermienreichen Fraktion (Fraktion 2) von Rüde 1.

Die Vesikel unterschiedlicher Größen und unterschiedlicher Morphologie liegen meist in Gruppen, zum Teil aber auch einzeln zwischen den Spermien (siehe Pfeile).

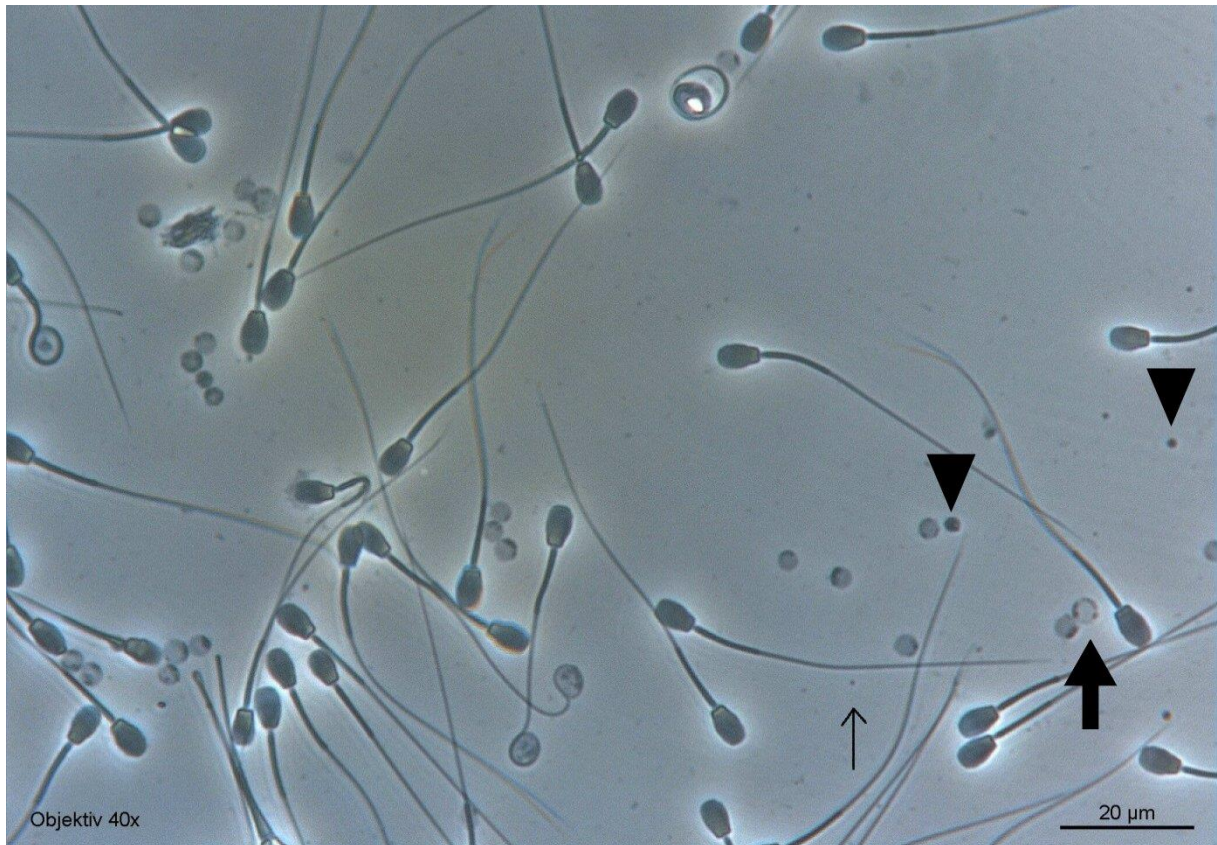


Abb. 5: Lichtmikroskopische Aufnahme (400-fache Vergrößerung) der spermienreichen Fraktion (Fraktion 2) von Rüde 1, die die unterschiedliche Morphologie der Vesikel deutlich darstellt.

Zu sehen sind sehr große Vesikel, die weitgehend leer erscheinen und eine marginale Ansammlung von granulärem Material aufweisen (dicker Pfeil, Vesikeldurchmesser hier etwa 3,8 µm). Außerdem mittelgroße und kleinere Vesikel mit dichtem Inhalt (Pfeilspitze, Vesikeldurchmesser hier etwa 2,4 µm bzw. 1,5 µm). Darüber hinaus lassen sich sehr kleine Vesikel darstellen (dünner Pfeil, Vesikeldurchmesser hier etwa 0,65 µm).

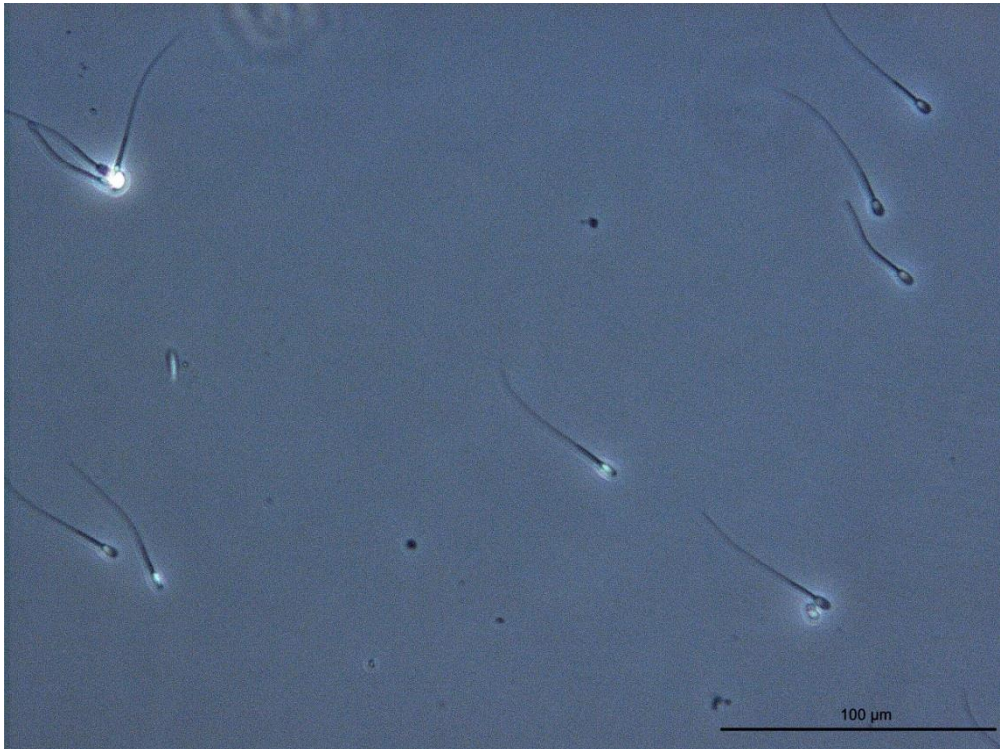


Abb. 6: Lichtmikroskopische Aufnahme (200-fache Vergrößerung) der dritten Fraktion von Rüde 1.

Zwischen den Spermien sind nur wenige Vesikel zu sehen. Im Vergleich zu Bild 1 und 2 (Fraktion 2) ist eine deutliche Reduktion der Vesikelzahl in dieser Ejakulatsfraktion festzustellen.

4.2 Ergebnisse der Transelektronenmikroskopie

Von 18 Probanden, 15 fertilen und 3 infertilen Rüden, nämlich den Rüden (Nr. 17, 32-Hypokinozoospermie, Nr. 35 - Azoospermie/Kastrat) wurden Proben für die elektronenmikroskopische Untersuchung aufgearbeitet.

4.2.1 Deskriptive Beobachtung

Die Vesikel stellten sich als membranumschlossene, größtenteils rundlich-ovale Strukturen dar. Zumeist bestand die membranöse Begrenzung aus einer zweischichtigen Membran (Doppelmembran). Vereinzelt zeigten sich Vesikel, die durch mehrere Membranen umschlossen waren (siehe Abb. 7).

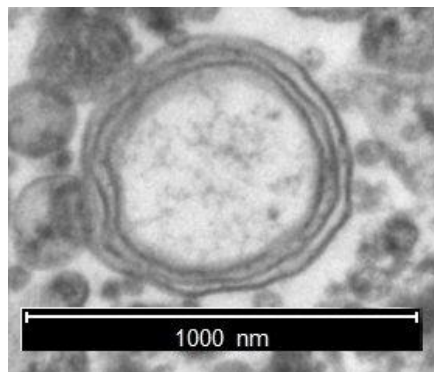


Abb. 7: Dargestellt ist ein Vesikel, das von mehreren Membranen umschlossen ist

Die schon im Lichtmikroskop beobachteten, morphologischen Unterschiede konnten mit Hilfe der transelektronenmikroskopischen Darstellung noch genauer definiert werden. Auf dieser Basis wurde die Vesikelpopulation in elf unterschiedliche Typen eingeteilt. Als Kriterien für die Einteilung dienten zum einen der Durchmesser der Vesikel, zum anderen aber auch die Struktur, Zusammensetzung und Elektronendichte des Inhaltes. So wurden zunächst „leere“ Primärvesikel (= Abwesenheit von weiteren Vesikeln innerhalb eines Vesikels) von solchen, die in ihrem Inneren Sekundär- oder Tochtervesikel beinhalten (= gefüllte Vesikel), differenziert. „Leere“ Primärvesikel wiederum wurden je nach Struktur und Dichte ihres Inhaltes verschiedenen Typen zugeordnet. Beobachtete Varianten waren spärlich vorhandenes, wolkig strukturiertes Material mit Dominanz von optisch leeren Räumen im vesikulären Innenraum (Typ A), stellenweise sehr dicht gelagertes Material mit optisch leeren Freiräumen („kuhfleckenartiges“ Muster des Inhaltes, Typ B) und eine homogen erscheinende Struktur des Inhaltes, der die Vesikel vollständig ausfüllte. Letztere Variante wurde weiterhin nach der Elektronendichte des Füllmaterials unterschieden (Typ

C1 bzw. C2). Der Vesikeldurchmesser als Einteilungskriterium für Typ B wurde aufgrund des charakteristischen, strukturellen Erscheinungsbildes nicht eingegrenzt. Da Vesikel eines sehr geringen Vesikeldurchmessers den Großteil der Vesikelgesamtheit ausmachten, wurden sehr kleine Vesikel (Typ F und G) zusätzlich typisiert und als Einteilungskriterium ein Vesikeldurchmesser von < 100 nm festgelegt. Die zwei Varianten dieses Typs unterschieden sich nach der Intensität der Elektronendichte des Inhalts. Typ F und G umfassen sehr kleine Varianten, die morphologisch den Bildern von Typ A und C entsprechen. Daher wurde für die Typen A und C der Vesikeldurchmesser ebenfalls auf ≥ 100 nm eingegrenzt.

Die Klassifizierung gefüllter Vesikel erfolgte einerseits anhand der Anzahl der innen liegenden Tochtervesikel (Typ i \Leftrightarrow Typ H, Typ K). Andererseits aber auch anhand des Durchmessers der Sekundärvesikel (Typ H \Leftrightarrow Typ K). Aufgrund der enormen Spannweite des Vesikeldurchmessers innerhalb des Typs K und einer auffälligen Seltenheit von sehr großen Ausprägungsformen wurden zwei Varianten (Typ K1 und K2) nach der Größe unterschieden, um Unterschiede zwischen den Probanden besser abbilden zu können. Zusätzlich wurden längliche Vesikel (Typ L) beobachtet, die sich aufgrund ihrer Form von den restlichen Vesikeln abgrenzten.

Die verschiedenen Vesikeltypen und ihre charakteristischen, morphologischen Eigenschaften sind in Tab. 6 aufgeführt.

Tab. 6: Vesikeltypen und Einteilungskriterien

Typ	Eigenschaften	
Helle Vesikel		
A	Form	rund bis oval
	Begrenzung	Doppelmembran
	Inhalt	wolkig verteiltes, spärlich vorhandenes, amorphes Material mit Dominanz optisch leerer Räume im vesikulären Innenraum
	Durchmesser	≥100 nm
B	Form	rund bis oval
	Begrenzung	Doppelmembran
	Inhalt	Kuhfleckenartiges Muster durch charakteristisch-wechselnde

Ergebnisse

		Anordnung von wolkigem, dichtem, amorphem Material und optisch leeren Bereichen
	Durchmesser	unterschiedlich
C1	Form	rund bis oval
	Begrenzung	Doppelmembran
	Inhalt	Schwach elektronendichtes, amorphes, homogen erscheinendes Material ohne optisch leere Zwischenräume
	Durchmesser	≥ 100 nm
Dunkle Vesikel		
C2	Form	rund bis oval
	Begrenzung	Doppelmembran
	Inhalt	Stark elektronendichtes, amorphes, homogen erscheinendes Material ohne optisch leere Zwischenräume
	Durchmesser	≥ 100 nm
Sehr kleine Vesikel		
F	Form	rund bis oval
	Begrenzung	Doppelmembran
	Inhalt	Stark elektronendichtes, amorphes Material
	Durchmesser	< 100 nm
G	Form	rund bis oval
	Begrenzung	Doppelmembran
	Inhalt	Schwach elektronendichtes, wolkig verteiltes, spärlich vorhandenes, amorphes Material
	Durchmesser	< 100 nm
Gefüllte Vesikel		
i	Form	rund bis oval
	Begrenzung	Doppelmembran
	Inhalt	Wenige Vesikel (≤ 3), dazwischen wolkig, spärlich verteiltes, amorphes Material und optisch leere Bereiche
	Durchmesser	Klein bis mittelgroß

Ergebnisse

H	Form	rund bis oval
	Begrenzung	Doppelmembran
	Inhalt	Zahlreiche (>3), sehr kleine Vesikel (< 100 nm) und amorphes Material
	Durchmesser	variabel
K1	Form	rund bis oval
	Begrenzung	Doppelmembran
	Inhalt	Zahlreiche, unterschiedliche große Vesikel (>3) und amorphes Material
	Durchmesser	< 1000 nm
K2	Form	rund bis oval
	Begrenzung	Doppelmembran
	Inhalt	Teils marginal, teils über gesamtes Vesikel verteilte Tochtervesikel unterschiedlicher Größen (Zahl variabel), dazwischen wolkiges, amorphes Material und optisch leere Bereiche möglich
	Durchmesser	≥ 1000 nm
L	Form	Länglich
	Begrenzung	Doppelmembran
	Inhalt	Unterschiedlich dicht vorhandenes, amorphes Material
	Durchmesser	variabel

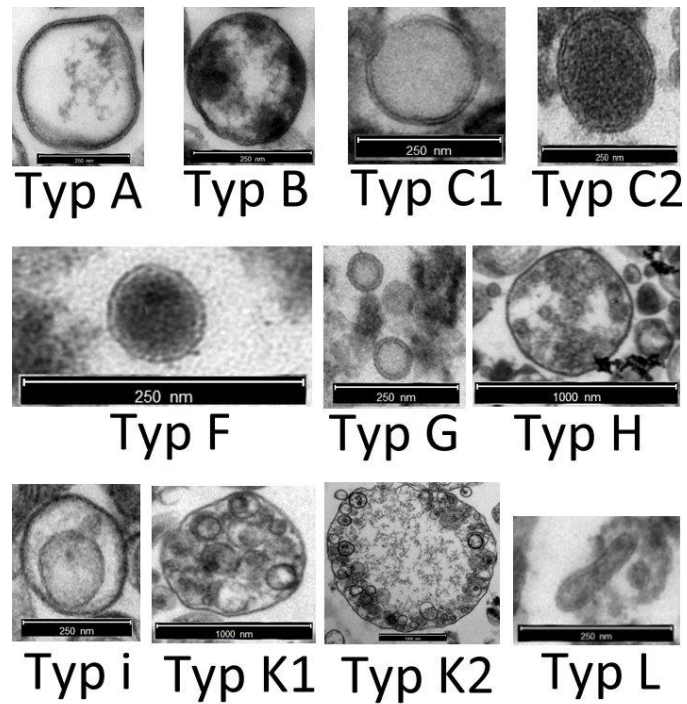


Abb. 8: Elektronenmikroskopische Darstellung der Vesikeltypen

Während Vesikel vom Typ H ausschließlich Tochtervesikel vom Typ F und G beinhalteten, zeigte Vesikeltyp K eine sehr variable Zusammensetzung der Füllvesikel, die sowohl die Typen A, B, C, F, G als auch i umfasste. Primärvesikel vom Typ i enthielten Tochtervesikel vom Typ A, B, C, F oder G.

Des Weiteren zeigten sich, wie in Abb. 9 zu sehen, bei einigen wenigen Vesikeln stielartige Ausziehungen der Doppelmembran an der Vesikeloberfläche.

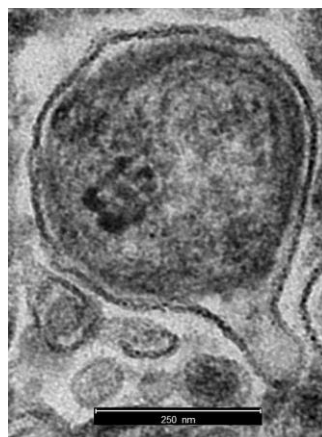


Abb. 9: Vesikel mit nasenartiger Ausziehung der Vesikelmembran

Hinweise auf eine Interaktion der Vesikel untereinander oder der Vesikel und der Spermien gingen aus den Aufnahmen nicht hervor.

4.2.2 Messung der Vesikeldurchmesser

Für die Messung der Vesikeldurchmesser wurden die Varianten C1 und C2 sowie die Typen F und G aufgrund der ähnlichen Größenverhältnisse jeweils zusammengefasst ausgewertet. Außerdem wurden die länglichen Vesikel nicht gemessen, weil deren variable Form keine Werte zugelassen hätte, die innerhalb des Typs vergleichbar gewesen wären. Somit wurden Werte für acht Vesikelgruppen ermittelt. Die Ergebnisse sind in den Tab. 7-9 dargestellt. Für die Ermittlung des gewichteten Mittelwertes wurden die Daten der Häufigkeitsverteilung (siehe Abb. 10–12) der einzelnen Vesikeltypen zugrunde gelegt. Die Ermittlung einer Standardabweichung über alle gemessenen Vesikelwerte war statistisch gesehen nicht sinnvoll, da eine rechtsschiefe Verteilung der Werte vorlag, die sehr hohe Standardabweichungen ergeben hätte, die nicht interpretierbar gewesen wären. Die einzelnen Typen sind zudem Ausschnitte aus der Gesamtverteilung, deren Einteilung teilweise anhand der Größe erfolgte und damit eine Ermittlung der Standardabweichung ebenfalls sinnlos macht. Daher wurden lediglich Mittelwerte und Extremwerte der einzelnen Typen sowie der Gesamtverteilung angegeben.

Der mittlere Vesikeldurchmesser lag sowohl bei fertilen als auch bei infertilen Rüden etwa im Bereich von 195-204 nm (gewichtete Mittelwerte der Vesikelgesamtheit, jeweils von Rüden mit Normo-, Hypo- und Azoospermie). Auffällige Unterschiede zwischen fertilen und hypokinozoospermen Probanden ergaben sich hinsichtlich Vesikeltyp K1 und K2. Während der mittlere Vesikeldurchmesser der Vesikelvariante K1 bei den infertilen Probanden um 35% höher lag als bei den fertilen, lag der mittlere Vesikeldurchmesser der Vesikelvariante K2 um etwa 30% niedriger. Auch der obere Extremwert von K2, in allen Fällen identisch mit dem Maximalwert der Vesikelgesamtheit, der normospermen Rüden (3289,344 nm) unterschied sich deutlich vom entsprechenden Wert der Probanden mit Hypokinozoospermie (2096,775 nm) sowie noch deutlicher von demjenigen des Kastraten (1314,061 nm). Dies bestätigte die lichtmikroskopischen Beobachtungen, bei welchen im Ejakulat des Kastraten im Vergleich zu anderen Probanden eine deutlich geringere Vesikelgröße auffiel. Weitere Differenzen zwischen Probanden mit Normo- und Azoospermie fanden sich beim Vergleich der mittleren Werte der Typen A und B. Der durchschnittliche Vesikeldurchmesser des Vesikeltyps A des Kastraten lag um etwa 25% höher als bei

Ergebnisse

gesunden Probanden, wohingegen der mittlere Wert von Typ B um 30% unter dem Vergleichswert lag.

Tab. 7: Ergebnisse der Messung der Vesikeldurchmesser bei Normospermie (n= 15) in nm

Typ	A	B	C1/C2	F/G	i	H	K1	K2	Gesamt ¹
n	720	694	713	727	509	628	351	230	4572
\bar{x}	211,4	238,8	211,0	66,1	207,6	343,3	487,4	1746,4	195,1 ²
Min.	100,0	39,1	100,0	24,6	51,2	100,00	95,9	1003,7	24,6
Max.	842,4	689,4	1300,1	99,8	807,5	964,0	994,9	3289,3	3289,3

n= Anzahl der gemessenen Vesikel; \bar{x} = arithmetischer Mittelwert; Min.= Minimum; Max.= Maximum; 1= typenunabhängige Gesamtwerte; 2= gewichteter Mittelwert

Tab. 8: Ergebnisse der Messung der Vesikeldurchmesser bei Hypokinozoospermie (n= 2) in nm

Typ	A	B	C1/C2	F/G	i	H	K1	K2	Gesamt ¹
n	100	100	100	100	59	88	58	28	633
\bar{x}	200,4	243,0	226,8	65,9	184,8	360,8	659,6	1267,0	195,8 ²
Min.	101,3	39,6	100,2	21,0	27,9	40,7	143,0	1028,2	21,0
Max.	590,8	612,5	697,0	94,9	483,2	1085,1	978,1	2096,8	2096,8

n= Anzahl der gemessenen Vesikel; \bar{x} = arithmetischer Mittelwert; Min.= Minimum; Max.= Maximum; 1= typenunabhängige Gesamtwerte; 2= gewichteter Mittelwert

Tab. 9: Ergebnisse der Messung der Vesikeldurchmesser bei Azoospermie (n= 1) in nm

Typ	A	B	C1/C2	F/G	i	H	K1	K2	Gesamt ¹
n	24	16	50	50	42	20	32	7	241
\bar{x}	266,6	173,3	249,2	62,1	236,5	304,6	475,1	1186,2	204,2 ²
Min.	102,1	59,5	102,4	24,2	75,3	22,2	109,8	1085,9	22,2
Max.	601,1	542,9	655,1	98,7	731,7	731,1	995,1	1314,1	1314,1

n= Anzahl der gemessenen Vesikel; \bar{x} = arithmetischer Mittelwert; Min.= Minimum; Max.= Maximum; 1= typenunabhängige Gesamtwerte; 2= gewichteter Mittelwert

4.2.3 Häufigkeitsverteilung der unterschiedlichen Vesikeltypen

Darüber hinaus wurde die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Vesikeltypen ermittelt, um typenspezifische Dominanzen in der Verteilung und eventuelle Unterschiede zwischen den Probanden festzustellen. Die Ergebnisse sind in Tab. 43 und 44 (Anhang) und in den Abb. 10-12 dargestellt. Insgesamt wurden für die Ermittlung der Häufigkeitsverteilung bei Normospermie 3249 Vesikel von 15 Probanden ausgezählt. Dagegen kamen bei Hypokinozoospermie 425 Vesikel (n=2) und bei Azoospermie (Kastrat, n=1) 213 Vesikel zur Auswertung.

Die Gruppe der sehr kleinen Vesikel (Typen F und G) zeigte sowohl bei Normospermie als auch bei Hypokinozoospermie und Azoospermie eine klare Dominanz über die anderen Typen. Der Anteil lag bei Normospermie bei 42,75%. Während er bei Hypokinozoospermie (39,53%) nur geringfügig niedriger lag, fiel er bei Azoospermie sogar um 8%-Punkte geringer aus (34,28%) als bei Normospermie. In allen Gruppen fanden sich mehr Vesikel vom Typ G als vom Typ F. Die Zahl der Vesikel von Typ F lag bei gesunden Probanden um weniger als 1/3, bei Hypokinozoospermie um mehr als 1/3 niedriger als bei Typ G. Bei Azoospermie war der Anteil von Vesikeltyp G an der Vesikelgesamtheit sogar doppelt so groß wie derjenige von Typ F. Der dritt- bzw. vierthäufigste Vesikeltyp bei Normospermie waren Typ B und Typ i, die jeweils einen Anteil von etwa 11% an der Vesikelgesamtheit hatten. Mit je circa 8% folgten diesen die Typen A und C1, wobei die Typen C2 (7,08%) und H (6,53%) in ihren Anteilen nur wenig niedriger lagen. Typ K1 (2,52%), Typ K2 (1,82%) und Typ L (0,46%) machten nur eine Minderheit der gesamten Vesikelpopulation aus. Anders als bei Normospermie war bei Hypokinozoospermie Typ C1 der dritthäufigste Vesikeltyp (12,94%), dicht gefolgt von Typ H (11,06%) und Typ B (10,12%). Typ B lag damit ähnlich hoch wie bei Normospermie, der Anteil von Typ H allerdings war fast doppelt so hoch wie der entsprechende Anteil, der bei den gesunden Probanden ermittelt wurde. Die Anteile der Typen A, C2 und i lagen zwischen 6 und 7% und somit geringer als bei Probanden mit unauffälligem Spermogramm. Die Typen H, K1, K2 und L zählten auch hier zur Minderheit, die von Typ K1 (3,29%) dominiert wurde. Im Gegensatz zu den Werten der gesunden Probanden war der Anteil von Typ K2 um mehr als die Hälfte erniedrigt (0,71%) und derjenige von Typ L im Vergleich stark erhöht (1,65%). Die Verhältnisse bei Azoospermie unterschieden sich ebenfalls von denjenigen bei Normospermie. Der häufigste Vesikeltyp neben Typ G war hier Typ C1 (15,49%). Daran anschließend folgte Typ i mit einem Anteil von 13,62%. Sowohl Typ C1 als auch Typ i lagen in ihren Anteilen an der Vesikelgesamtheit damit

höher als bei den anderen Gruppen. Typ C2 und Typ H machten jeweils 9,39% der Vesikelpopulation bei Azoospermie aus. Der Vesikeltyp B kam mit etwa 6% deutlich weniger häufig vor als bei Normospermie. Auch Typ A (3,76%) gehörte hier eher zur Vesikelminderheit. Der Anteil von Typ K1 dagegen war fast doppelt so hoch wie bei den gesunden Probanden. Während der Vesikel vom Typ K2 nur etwa 1% ausmachten, lag der Anteil von Typ L (1,88%) -ähnlich wie bei Hypokinozoospermie- deutlich höher als bei Normospermie.

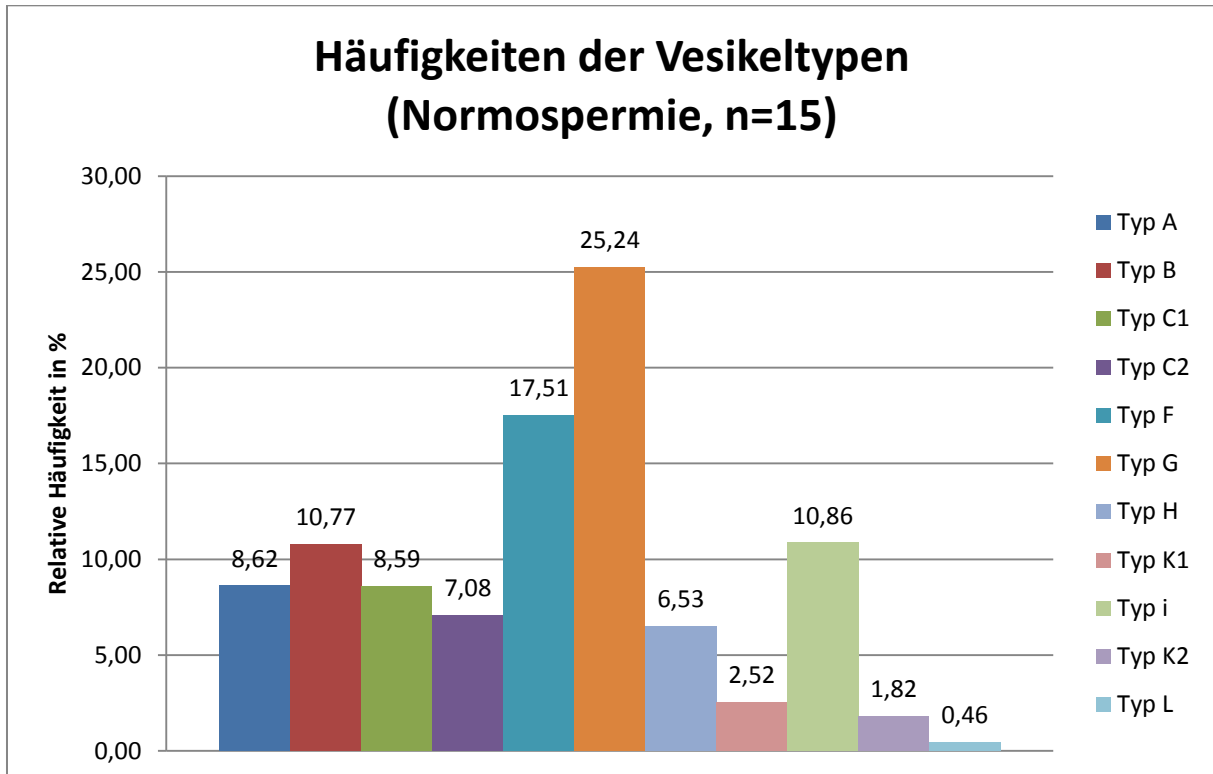


Abb. 10: Häufigkeiten der Vesikeltypen im Ejakulat bei Rüden mit Normospermie (n=15)

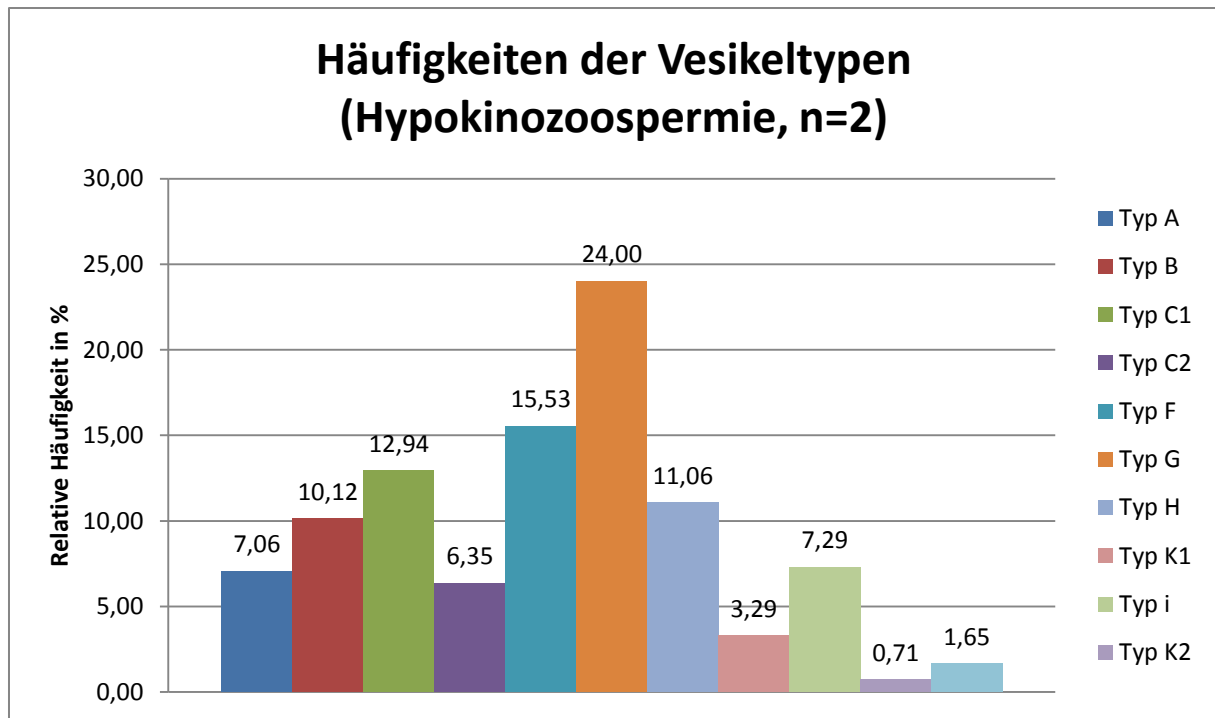


Abb. 11: Häufigkeiten der Vesikeltypen im Ejakulat bei Rüden mit Hypokinozoospermie (n=2)

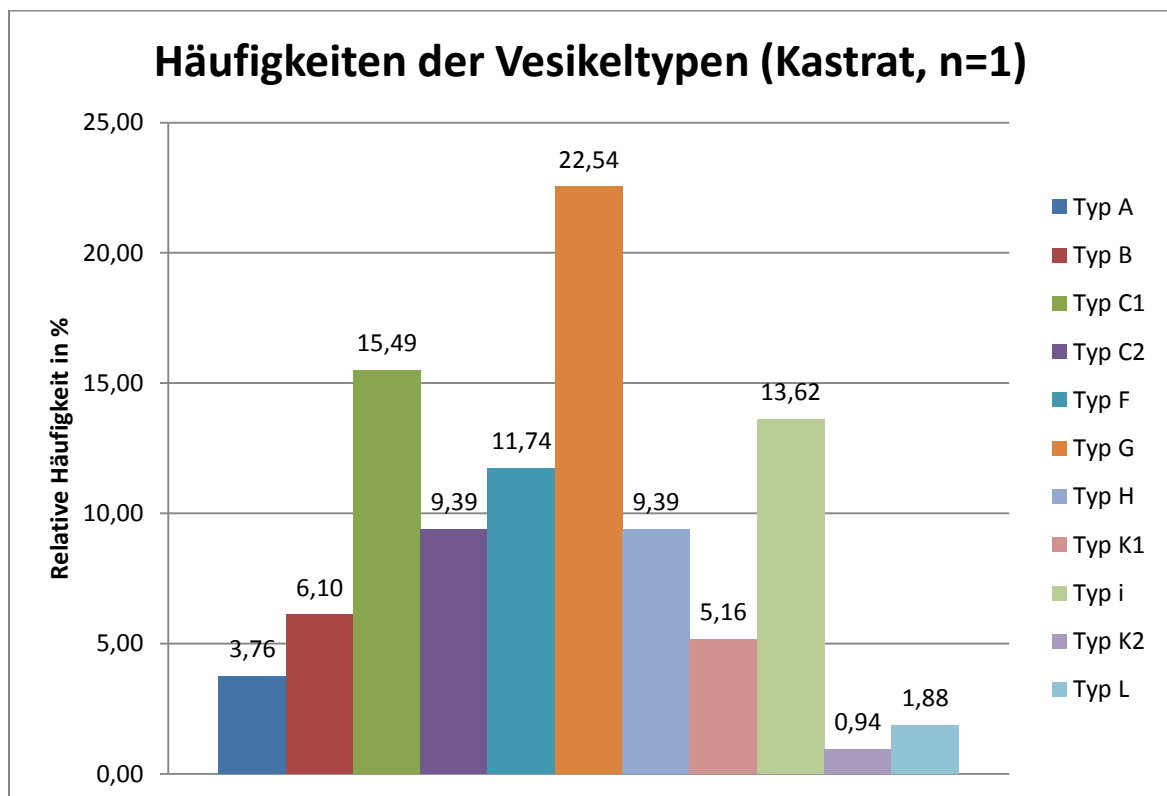


Abb. 12: Häufigkeiten der Vesikeltypen im Ejakulat bei Rüden mit Azoospermie (Kastrat, n=1)

4.3 Ergebnisse der Lipidanalyse

Der Phospholipid-Gehalt der Proben von 14 normospermen Rüden konnte mittels Hochleistungsdünnschicht- chromatographie mit nachfolgender Iodfärbung optisch dargestellt und anschließend densitometrisch gemessen werden. Wie in Abb. 13 zu sehen, ließen sich anhand der dünnschichtchromatographischen Auftrennung nach Iodfärbung der HPTLC-Platte Sphingomyelin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin und Cholesterol in den Vesikelproben nachweisen.

An Position 1 wurden die Lipid-Standardlösungen der vier untersuchten Substanzen aufgetragen, während an Position 2-6 Vesikelproben von fünf unterschiedlichen Rüden appliziert wurden. Die R_f -Werte der Standards und Proben wurden für das in Abb. 13 dargestellte Analyseergebnis errechnet und sind in Tab. 10 vergleichend aufgelistet, wobei der Wert der Proben als arithmetischer Mittelwert aus den fünf Proben dargestellt ist. Im Unterschied zu den R_f -Werten von Phosphatidylethanolamin und Cholesterol, bei welchen die mit Hilfe der Standardproben ermittelten Werte mit denjenigen der Vesikelproben übereinstimmten, zeigten die Standard-Werte von Sphingomyelin und Phosphatidylcholin eine leichte Abweichung von denen der vesikulären Proben. Trotzdem wurde eine Übereinstimmung der Substanzen in den jeweiligen Banden angenommen. Das Auftrennungsergebnis der Vesikelproben aus Abb. 13 wiederholte sich in sehr ähnlicher Weise bei allen 14 untersuchten Rüden.

Die quantitativen Unterschiede im Gehalt an den einzelnen Lipidsubstanzen zwischen den Probanden werden in Abb. 13 durch die unterschiedliche Intensität der Iod-Anfärbung deutlich. Hier wurde in Anlehnung an das Vorgehen in der Literatur als Bezugsgröße der Vesikelproteingehalt genutzt und auf jeder Position ein Probenvolumen aufgetragen, welches 20 µg Vesikelprotein entsprach, um die Proben untereinander vergleichbar zu machen. Die Intensität der Banden der Phospholipide an Position 2 und 4 ist deutlich schwächer als an den Positionen 3, 5 und 6.

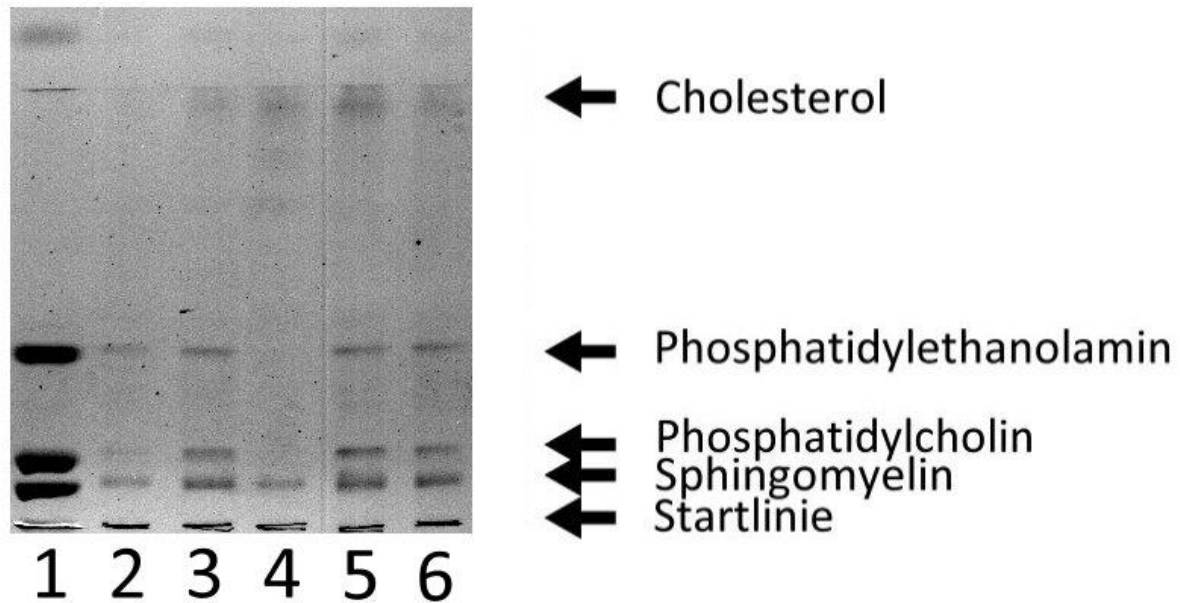


Abb. 13: Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Vesikelproben mittels HPTLC.

Position 1: Standardproben von Sphingomyelin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Cholesterol, Position 2 bis 6: Vesikelproben unterschiedlicher Ründen (je 20 µg Vesikelprotein enthaltend)

Tab. 10: R_f -Werte zur Auswertung der dünnschichtchromatographischen Auftrennung bezüglich Abb. 13

Lipidsubstanzen	R_f -Werte Stand. (gerundet)	R_f -Werte Prob. (\bar{x} , gerundet, n=5)
SM	0,06	0,07
PC	0,10	0,11
PE	0,27	0,27
Ch	0,76	0,76

SM= Sphingomyelin; PC= Phosphatidylcholin; PE= Phosphatidylethanolamin; Ch= Cholesterol; R_f -Werte Stand.= R_f -Werte der Standards; R_f -Werte Prob.= R_f -Werte der Banden aus den Proben auf jeweils ähnlicher Höhe

Bei einigen Proben fielen darüber hinaus weitere Banden mit folgenden R_f -Werten auf: 0,23, 0,26, 0,60, 0,64, 0,87, 0,93 und 0,98 (siehe Abb. 14). Diese waren aufgrund fehlender, weiterer Standards nicht näher identifizierbar.

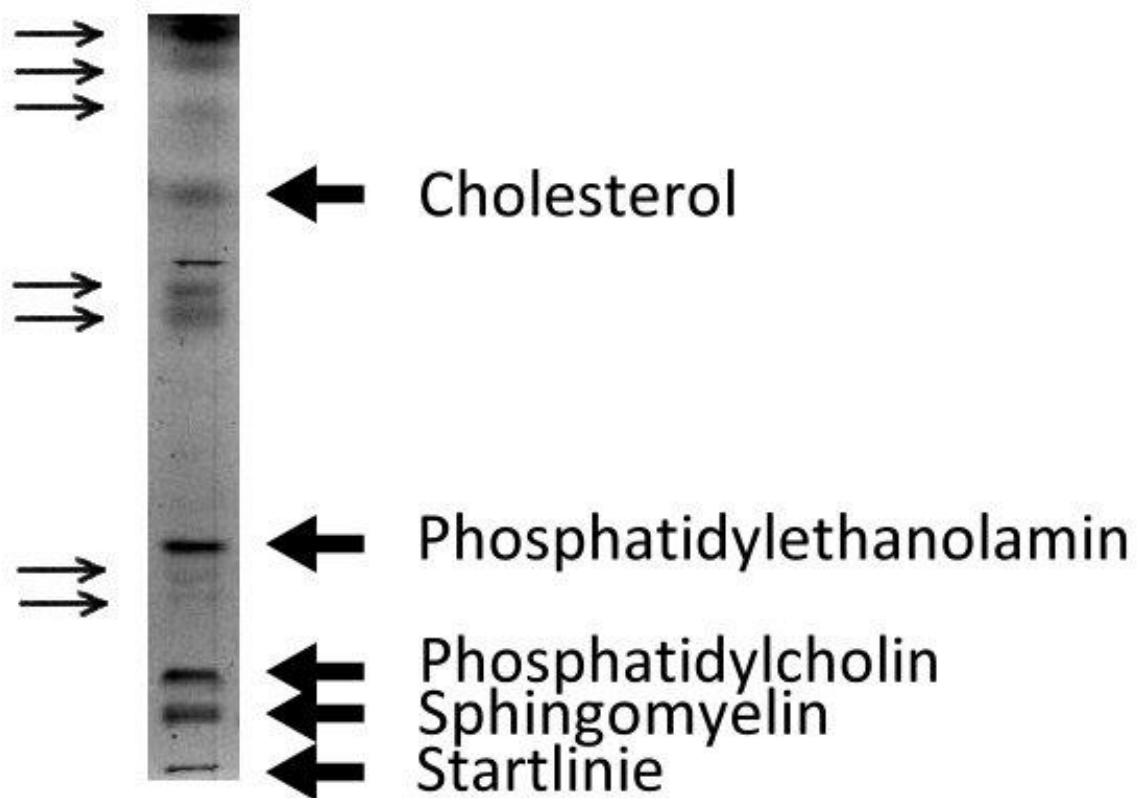


Abb. 14: Die dünnschichtchromatographische Auftrennung einiger Proben zeigte ein komplexes Lipidmuster.

Neben den 4 untersuchten Lipidsubstanzen fielen weitere Banden unterschiedlicher R_f -Werte auf (dünne Pfeile).

Die densometrische Messung der Iod-gefärbten Banden auf den HPTLC-Platten ergab Werte, die Tab. 45 (Anhang) zu entnehmen sind. Um eine Vergleichbarkeit der Werte zwischen den Proben zu ermöglichen, diente auch hier der Gehalt an Vesikelprotein in der Probe in μg bzw. das eingesetzte Probenvolumen in μl als Bezugsgröße für den Phospholipidgehalt in μg . Die Werte zeigten eine sehr große Spannweite und waren nicht normalverteilt. Daher wurde eine logarithmische Transformation der Daten zur Ermittlung des geometrischen Mittelwertes und des Streufaktors vorgenommen. Der durchschnittliche Sphingomyelingehalt (geometrischer Mittelwert) lag bei $0,076 \times 1,73^{\pm 1} \mu\text{g}$ Sphingomyelin/ μg Vesikelprotein (Spannweite: $0,021\text{-}0,200 \mu\text{g}$ Sphingomyelin/ μg Vesikelprotein, $n=14$), der durchschnittliche Gehalt an Phosphatidylcholin belief sich auf $0,052 \times 2,17^{\pm 1} \mu\text{g}$ Phosphatidylcholin/ μg Vesikelprotein (Spannweite: $0,009\text{-}0,160 \mu\text{g}$ Phosphatidylcholin/ μg

Vesikelprotein, n=14) und der durchschnittliche Gehalt an Phosphatidylethanolamin betrug $0,200 \times 1,83^{\pm 1}$ μg Phosphatidylethanolamin/ μg Vesikelprotein (Spannweite: 0,060-0,500 μg Phosphatidylethanolamin/ μg Vesikelprotein, n=14).

Bei 12 der 14 untersuchten Proben fanden sich folgende mengenmäßigen Relationen der Phospholipide: Phosphatidylethanolamin > Sphingomyelin > Phosphatidylcholin. Das Verhältnis von Phosphatidylcholin zu Phosphatidylethanolamin lag bei 7 Probanden im Bereich von 0,34 bis 0,52, das von Sphingomyelin zu Phosphatidylethanolamin fand sich bei 9 Probanden im Bereich von 0,39 bis 0,58 und das Verhältnis von Phosphatidylcholin zu Sphingomyelin lag bei 8 Probanden im Bereich von 0,81 bis 1,19.

Der durchschnittliche Cholesterolgehalt lag bei $0,078 \times 3,02^{\pm 1}$ μg Cholesterol/ μg Vesikelprotein (Spannweite: 0,009-0,244 μg Cholesterol/ μg Vesikelprotein, n=11). Die Auswertung der Probe von Rüde 17 (Hypokinozoospermie) ergab einen Cholesterolgehalt von 0,010 μg Cholesterol/ μg Vesikelprotein.

4.4 Ergebnisse der Proteinanalyse

4.4.1 SDS-PAGE

Es fand eine Untersuchung des Proteinmusters von Vesikelproben (n=14) und von Spermienproben (n=7) statt. Die Proteinzusammensetzung der vesikulären Partikel war komplex. Nach elektrophoretischer Auftrennung der vesikulären Probe zeigten sich im Coomassie-gefärbten Proteingel (siehe Abb. 15) deutliche Banden bei etwa 17 und 40 kDa sowie etwas schwächer bei 60 und 65 kDa. Im Unterschied dazu stellten sich die Banden der aufgetrennten Spermienproben im Bereich von < 15 kDa dar. Diese Verhältnisse ließen sich ebenso in Ansätzen mit nachfolgender Silberfärbung, die auch sehr geringe Proteinmengen detektierbar machte, nachweisen (siehe Abb. 16-17). Im Silber-gefärbten Proteingel zeigten sich zahlreiche, unterschiedlich starke Banden im gesamten Detektionsbereich (etwa 10-170 kDa). Besonders prominente Banden lagen in der vesikulären Probe bei 15-17 und 40 kDa. Bei der Untersuchung der Spermienproben waren dagegen starke Signale im Bereich von < 15 und 25 kDa nachweisbar. Weitere mittelstarke bis starke Banden der Vesikelproben fanden sich bei < 15 kDa sowie bei etwa 30, 60 und 65 kDa. Daneben waren, wie auf Abb. 16 zu sehen, schwache Signale insgesamt im Bereich von 10-170 kDa an verschiedenen Stellen erkennbar, die in ihrer Intensität zwischen den Probanden zum Teil variierten. Diese

Ergebnisse ließen sich auch bei wiederholter Untersuchung von Aliquots derselben Probe reproduzieren.

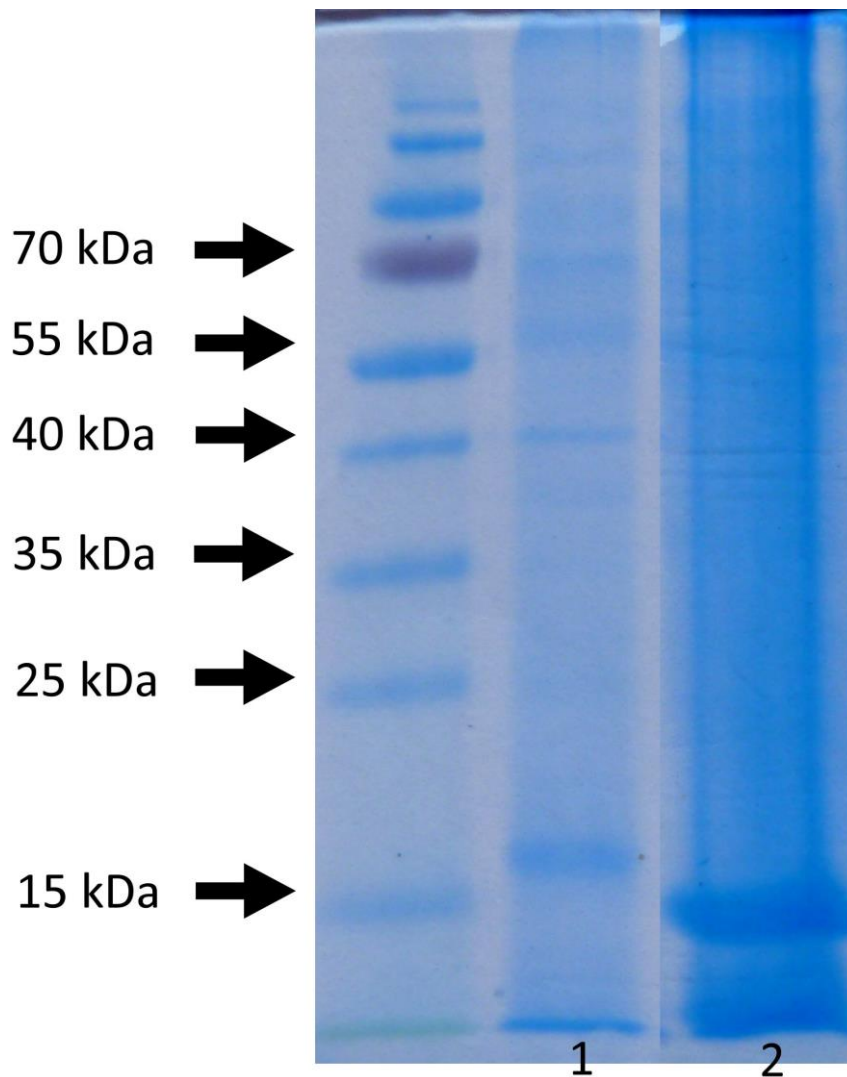


Abb. 15: Elektrophoretische Auftrennung von Vesikelprobe (1) und Spermienprobe (2) mit nachfolgender Coomassiefärbung

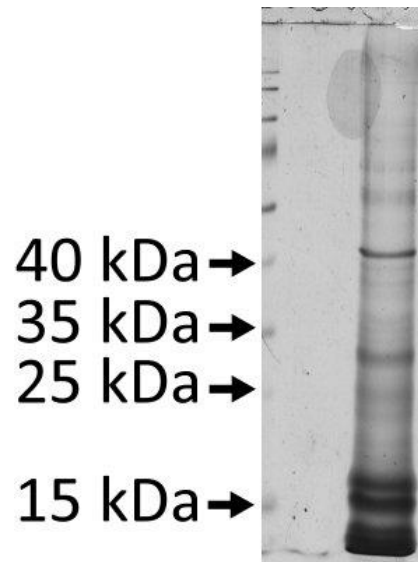


Abb. 16: Proteinmuster der Vesikel nach elektrophoretischer Auftrennung (SDS-PAGE) und Silberfärbung.

Im Unterschied zur Spermienprobe sind deutliche Banden bei etwa 15-17 und 40 kDa zu sehen. (links: Proteinladder, rechts: Vesikelprobe)

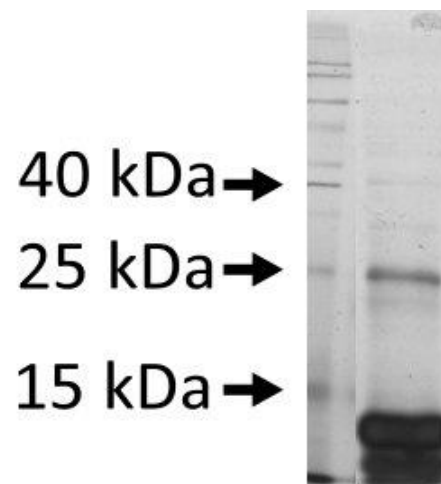


Abb. 17: Proteinmuster der Spermienproben nach elektrophoretischer Auftrennung (SDS-PAGE).

Deutliche Banden sind bei etwa < 15 und 25 kDa zu sehen. (links: Proteinladder; rechts: Spermienprobe)

4.4.2 MALDI-TOF-Analyse

Mehrere Banden aus einem Silber-gefärbten Proteingel wurden nach SDS-PAGE per MALDI-TOF-MS analysiert. Die Banden stammten insgesamt von 6 Rüden (Rüde 1, 2, 8, 11, 13, 14). Neben den prominenten Banden bei etwa 17 und 40 kDa wurden Banden im Bereich von 20 kDa, 30 kDa, 65 kDa und 100kDa untersucht. Die insgesamt 23 untersuchten Banden setzten sich wie folgt zusammen: 4x 17 kDa, 5x 20 kDa, 4x 30 kDa, 4x 40 kDa, 3 x 65 kDa und 3x 100 kDa. Die erhaltenen Daten der gemessenen Spektren wurden mit denjenigen der Proteindatenbank von *Canis lupus familiaris* nach dem MASCOT-Algorithmus abgeglichen. Nach Abgleich der Molekulargewichte der Trefferproteine aus den Datenbanken mit den Ergebnissen aus der elektrophoretischen Auftrennung der Probe konnten die in Tab. 11 aufgeführten Proteine in den Vesikelpuben identifiziert werden.

Tab. 11: Übersicht der Ergebnisse der MALDI-TOF-Analyse

Protein	n	MW (kDa)	Rüde	SC (%)	Mascot Score	p	Threshold
α_{cardiac} -Aktin, Isoform 3	2	42,0	Rüde 2	33,2	89	$\leq 0,05$	56
			Rüde 11	34	75,5		
α_{skeletal} -Aktin, Isoform 2	1	42,0	Rüde 2	28,6	73,9	$\leq 0,05$	56
β_{cyto} -Aktin	2	41,7	Rüde 1	34,4	113	$\leq 0,05$	56
			Rüde 11	47,5	114		
γ_{cyto} -Aktin	3	41,6	Rüde 1	28,5	80,3	$\leq 0,05$	56
			Rüde 2	50,7	110		
			Rüde 11	37,9	84		
S100 A9 Isoform 2	2	14,2	Rüde 8	42,1	80,3	$\leq 0,05$	56
			Rüde 11	33,3	66,9		

n= Zahl der Probanden mit positivem Befund; MW (kDa)= Molekulargewicht in kDa; SC (%)= Sequence coverage (englisch für Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen zwischen Probenpeptid- und Datenbankpeptidstruktur) in %; definiert als Verhältnis der übereinstimmenden Sequenzlänge zur Gesamtsequenzlänge des getroffenen Proteins; Mascot Score= $-10 \cdot \log_{10}(P)$ mit P= Wahrscheinlichkeit, dass das Ergebnis zufallsbedingt ist, Maß für Übereinstimmung/Homologie des Trefferproteins aus der Datenbank mit dem

Protein aus der Probe; p= Signifikanzwert; Threshold= englisch für Grenzwert, Mascot Score, wo $p=0,05$

4.5 Ergebnisse des Tiefgefrierversuches

4.5.1 Tiefgefrierversuch Teil 1

Wie schon in Abschnitt 3.8 dargestellt, wurde im ersten Teil der Studie zur Wirkung der Vesikel auf Tiefgefriersperma der Effekt von drei unterschiedlichen Behandlungsarten über die Zeit (Messzeitpunkte bei 0, 10 und 30 Minuten nach dem Auftauen der tiefgefrorenen Spermienproben) untersucht. Dabei wurden zu jedem Untersuchungszeitpunkt die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien lichtmikroskopisch geschätzt und Motilitätsparameter mittels CASA (Computer-assisted sperm analysis) gemessen. Zu den ausgewerteten Motilitätsparametern der Computer-gestützten Analyse gehörten die Gesamtmotilität, die progressive Motilität, die Streckenparameter DAP, DCL, DSL, die Geschwindigkeitsparameter VAP, VCL, VSL sowie die sich daraus ergebenden Parameter STR, LIN und WOB und darüber hinaus die Parameter ALH und BCF. Zu den Zeitpunkten 0 und 30 Minuten wurden zusätzlich das Lebend-Tot-Verhältnis der Spermien am Eosin-gefärbten Ausstrich, die pathomorphologischen Veränderungen der Spermien am Spermac®-gefärbten Ausstrich und der Status der Membranintegrität der Samenzellen mittels HOS-Test erfasst.

Der Unterschied zwischen den drei Behandlungsarten lag zum einen im Vesikelgehalt der untersuchten Spermienproben zum anderen im Zeitpunkt der Zugabe der Vesikel zu den Spermien. So wurden sowohl Spermien ohne Vesikel (Behandlungsgruppe 1) als auch mit einer bestimmten Vesikelmenge (Behandlungsgruppe 2) eingefroren und untersucht. Zusätzlich wurde eine dritte Behandlungsgruppe gebildet, bei der nach dem Auftauen des Tiefgefrierspermas zu einem Teil der vesikelfreien Spermienproben Vesikel zugesetzt wurden. Der Vesikelzusatz erfolgte derart, dass der Gehalt an Vesikelprotein der Proben aus Behandlungsgruppe 2 mit demjenigen der Proben aus Behandlungsgruppe 3 übereinstimmte.

Die spermatologische Untersuchung der Spermaproben aller zehn teilnehmenden Probanden war unauffällig, d.h. die Ergebnisse wichen nicht vom Referenzbereich ab.

Der Begriff „Messwert“ bezieht sich im Folgenden immer auf das arithmetische Mittel der entsprechenden Datengesamtheit bzw. bei wurzeltransformierten Daten (betrifft die

Parameter der subjektiv und computer-geschätzten Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien) auf den modifizierten Mittelwert, die aus den Einzelmessungen an zehn verschiedenen Probanden hervorging.

4.5.1.1 Subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit

Die subjektive Schätzung des Anteils der vorwärtsbeweglichen Spermien ergab nur zu Beginn deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen. Während die Spermienproben der Gruppe 1 anfänglich die höchste, mittlere Vorwärtsbeweglichkeit aufwiesen (32%), lagen die modifizierten Mittelwerte der Gruppen 2 und 3 zu diesem Zeitpunkt um 25% bzw. 16% niedriger. Im zeitlichen Verlauf verhielten sich die Spermien der vesikelhaltigen und vesikelfreien Gruppen ab 10 Minuten nach der ersten Messung relativ ähnlich. Alle Gruppen zeigten einen Abfall von etwa 23-24% auf 4-6%, wobei die vesikelfreien Spermienproben bei Messende die niedrigsten Werte zeigten (4,14%). Ein signifikanter Unterschied bezüglich der Behandlungen konnte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholungen nicht festgestellt werden, allerdings ein signifikanter Unterschied über die Zeit ($p \leq 0,0001$).

Tab. 12: Ergebnisse der subjektiv geschätzten, prozentualen Vorwärtsbeweglichkeit ($\bar{x}_{\text{mod}} \pm 1\text{-s-Bereich}$, Min., Max.) der Spermien in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit

Behandlungsart	T	n	\bar{x}_{mod} (%)	1-s-Bereich (%)		Min. (%)	Max. (%)
Behandlung 1	0	10	31,78	20,01	46,26	15,00	55,00
Behandlung 1	10	10	23,83	11,70	40,23	10,00	50,00
Behandlung 1	30	10	4,14	1,46	8,18	0,50	10,00
Behandlung 2	0	10	24,22	11,69	41,26	7,50	55,00
Behandlung 2	10	10	22,62	14,22	32,98	10,00	37,50
Behandlung 2	30	10	6,16	1,84	13,02	1,00	17,50
Behandlung 3	0	10	27,24	18,50	37,66	15,00	40,00
Behandlung 3	10	10	22,74	10,49	39,68	6,00	60,00
Behandlung 3	30	10	5,80	2,34	10,82	1,00	17,50

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; \bar{x}_{mod} = modifizierter Mittelwert nach Rücktransformation; Min.= Minimum; Max.= Maximum

4.5.1.2 Prozentuale Gesamtmotilität (CASA-Parameter)

Die Gesamtmotilität der Spermien ohne Vesikel nach dem Auftauen lag bei etwa 51% und zeigte bis Untersuchungsende einen kontinuierlichen, geringgradigen Abfall auf etwa 43%. Dagegen stieg die Beweglichkeit in den Spermienproben der anderen beiden Gruppen bis 10 Minuten nach dem Auftauen mäßig an, um danach stetig, geringgradig abzufallen. Während die Spermien, denen vor dem Einfriervorgang Vesikel zugesetzt worden waren, mit einer Gesamtmotilität von 35% starteten und damit deutlich unter den Werten der beiden anderen Proben lagen, wiesen die Spermien, denen nach dem Auftauen Vesikel zugesetzt worden waren, einen ähnlichen Wert auf wie diejenigen, die vesikelfrei waren. Die Spermien aus Behandlung 2 blieben fortwährend unter den Werten der anderen Gruppen und zeigten bei Untersuchungsende den niedrigsten Wert (34%). Die Spermien aus Behandlung 3 zeigten dagegen zu den Zeitpunkten 10 Minuten und 30 Minuten nach dem Auftauen die höchste Gesamtmotilität (50% bzw. 45%), auch wenn diese sich gegen Ende nicht deutlich von dem Wert der vesikelfreien Spermien unterschied. Die zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen ergab einen knapp nicht signifikanten Unterschied in den Behandlungen ($p=0,0555$). Nach graphischer Darstellung (siehe Abb. 18) ließ sich schlussfolgern, dass dem rechnerisch angedeuteten Unterschied höchstwahrscheinlich die abweichenden Werte von Behandlung 2 zugrunde liegen.

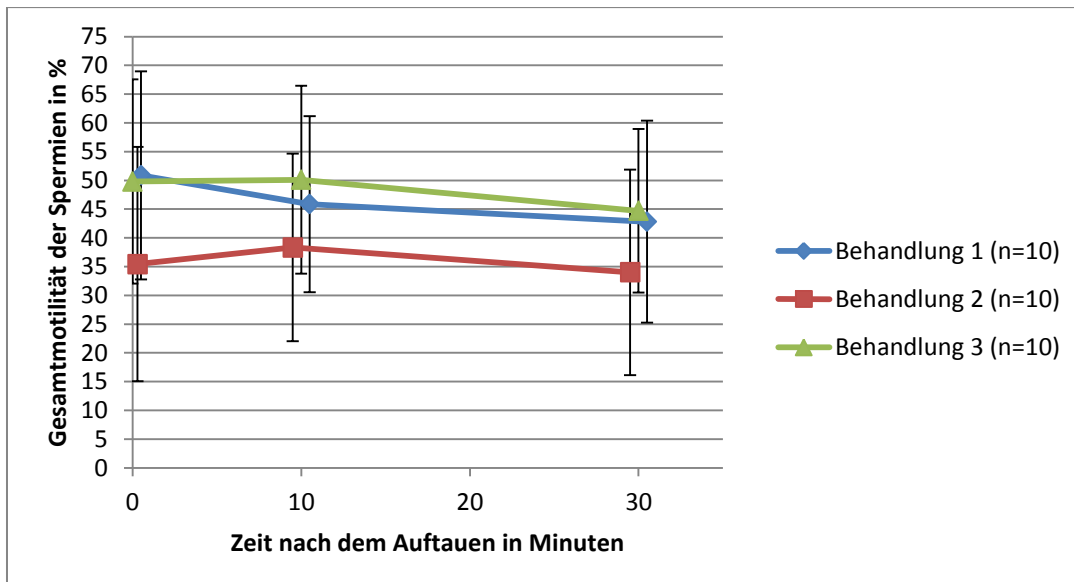


Abb. 18: Veränderung des prozentualen Anteils der Gesamtmotilität in den Spermienproben in Abhängigkeit der drei verschiedenen Behandlungen über die Zeit.

Dargestellt als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) mit positivem und negativem Fehlerbalken (SD; Standardabweichung); Behandlung 1: vesikelfreie Spermienproben, Behandlung 2: Zugabe

von Vesikeln zu den Spermien vor dem Einfrieren, Behandlung 3: Zugabe von Vesikeln zu den Spermien nach dem Auftauen, n= Anzahl der Proben

4.5.1.3 Prozentuale Vorwärtsbeweglichkeit (CASA-Parameter)

Zu Beginn der Messung ergaben sich Unterschiede zwischen den drei Gruppen bei der computergestützten Ermittlung der prozentualen Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien. Die Proben aus Behandlung 2 zeigten dabei höhere mittlere Werte (modifizierter Mittelwert) als die Proben aus den Behandlungen 1 und 3, welche relativ zum Wert der erstgenannten Gruppe um 16% bzw. 22% niedriger lagen. Bei der zweiten Messung nach 10 Minuten blieben die Ergebnisse der Gruppen 1 und 2 auf ähnlichem Niveau, einzig die Spermienproben aus Behandlung 3 zeigten einen leichten Anstieg der Vorwärtsbeweglichkeit. Im weiteren Kurvenverlauf bis Messende reduzierte sich die Vorwärtsbeweglichkeit der vesikelfreien Spermienprobe nur geringfügig auf 8,2%. Die vesikelhaltigen Proben dagegen fielen auf Werte von 5,4% (Gruppe 2) bzw. 6,6% ab. Der Unterschied der Werte über die Zeit war signifikant ($p = 0,0004$).

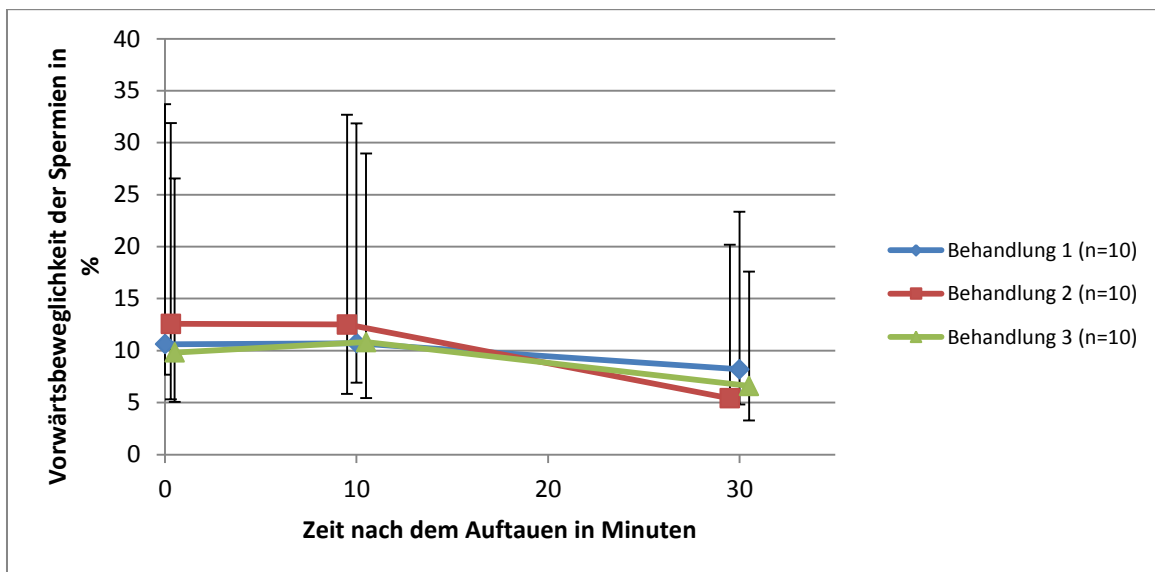


Abb. 19: Veränderung der prozentualen Vorwärtsbeweglichkeit (CASA-Parameter) in den Spermienproben in Abhängigkeit der drei verschiedenen Behandlungen über die Zeit.

Dargestellt als modifizierter Mittelwert mit positivem und negativem Fehlerbalken (1-s-Bereich) nach Rücktransformation; Behandlung 1: vesikelfreie Spermienproben, Behandlung 2: Zugabe von Vesikeln zu den Spermien vor dem Einfrieren, Behandlung 3: Zugabe von Vesikeln zu den Spermien nach dem Auftauen, n= Anzahl der Proben

4.5.1.4 CASA-Streckenparameter (DAP, DCL, DSL)

4.5.1.4.1 DAP

Der Motilitätsparameter DAP zeigte in den vesikelfreien Proben über die Zeit kaum eine Veränderung und lag im Bereich von 16,8-18,7 μm . Die vesikelhaltigen Proben aus den Gruppen 2 und 3 dagegen zeigten bis 10 Minuten nach dem Auftauen zunächst einen leichten Anstieg und lagen zu diesem Zeitpunkt bei höheren Werten (22,8 bzw. 19,1 μm) als die Proben aus Behandlung 1 (16,8 μm). 30 Minuten nach dem Auftauen fiel in den Gruppen 2 und 3 jedoch eine Reduktion der zurückgelegten Strecke um etwa 25% im Vergleich zum Ausgangswert auf, sodass zu diesem Messzeitpunkt in den Spermienproben ohne Vesikel der höchste Wert gemessen wurde. Bei der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen konnten für die ermittelten Messwerte sowohl signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen ($p=0,0107$) als auch über den zeitlichen Verlauf ($p=0,0021$) festgestellt werden. Die Graphik aus Abb. 20 legt nahe, dass der signifikante Unterschied zwischen den Behandlungen auf die mittleren Messwerte der Behandlungsgruppe 2 zurückzuführen ist.

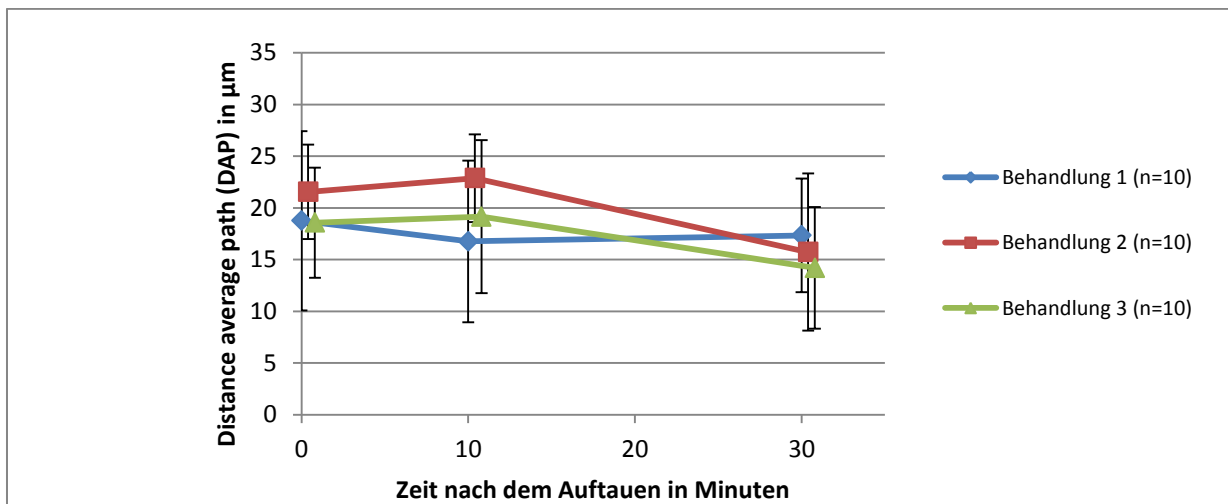


Abb. 20: Veränderung des Motilitätsparameters DAP in den Spermienproben in Abhängigkeit der drei verschiedenen Behandlungen über die Zeit.

Dargestellt als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) mit positivem und negativem Fehlerbalken (SD; Standardabweichung); Behandlung 1: vesikelfreie Spermienproben, Behandlung 2: Zugabe

von Vesikeln zu den Spermien vor dem Einfrieren, Behandlung 3: Zugabe von Vesikeln zu den Spermien nach dem Auftauen, n= Anzahl der Proben

4.5.1.4.2 DCL

Die zurückgelegte kurvilineare Strecke der Spermien aus den Proben ohne Vesikelzusatz betrug zu Beginn durchschnittlich etwa 30 μm und unterschied sich damit fast nicht von dem mittleren Wert, der in denjenigen Proben gemessen wurden, denen nach dem Auftauen Vesikel zugegeben worden waren. Im Unterschied dazu wurde in Gruppe 2 anfangs der höchste Wert (34,7 μm) ermittelt. Der mittlere Wert aus Gruppe 1 fiel im zeitlichen Verlauf bis 10 Minuten nach dem Auftauen der Proben um etwa 10% ab, um danach wieder leicht anzusteigen. Der Kurvenverlauf der Werte aus den Messungen der Spermien aus Behandlung 3 bezüglich des Parameters DCL war annähernd konstant und der Ausgangswert unterschied sich kaum vom gemessenen Endwert. Nach einem leichten Anstieg, fielen die Werte der Gruppe 2 nach 10 Minuten ab und reduzierten sich damit relativ zum Ausgangswert um etwa 13%. Die Ergebnisse der Messungen des Motilitätsparameters DCL glichen in ihren Verhältnissen zwischen den unterschiedlichen Gruppen denjenigen des im vorherigen Abschnitt beschriebenen Motilitätsparameters DAP. Dementsprechend wiesen die Spermien mit Vesikelzugabe vor dem Einfrieren bis 10 Minuten nach dem Auftauen die höchsten und die Spermien aus Behandlung 3 die niedrigsten Werte auf, während sich die Reihenfolge vom höchsten zum tiefsten Wert bis zum letzten Messzeitpunkt verschob (Behandlung 1 > Behandlung 2 > Behandlung 3). Anhand der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung konnten signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen ($p=0,0456$) nachgewiesen werden, die wahrscheinlich auf die Messwerte aus Gruppe 2 zurückzuführen sind (siehe Tab. 13).

Tab. 13: Ergebnisse der Messung des CASA-Streckenparameters DCL ($\bar{x} \pm \text{SD}$, Min., Max.) der Spermien in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm \text{SD}$ (μm)	Min. (μm)	Max. (μm)
Behandlung 1	0	10	$30,40 \pm 13,20$	0,00	43,60
Behandlung 1	10	10	$27,40 \pm 13,00$	7,80	44,70
Behandlung 1	30	10	$31,70 \pm 12,40$	18,80	54,80

Ergebnisse

Behandlung 2	0	10	34,70 ± 6,40	26,00	43,10
Behandlung 2	10	10	36,50 ± 5,60	30,20	48,70
Behandlung 2	30	10	30,00 ± 14,90	0,00	55,30
Behandlung 3	0	10	29,70 ± 8,40	19,50	47,20
Behandlung 3	10	10	31,50 ± 11,30	17,70	53,70
Behandlung 3	30	10	28,10 ± 12,50	12,30	50,50

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

4.5.1.4.3 DSL

Der Motilitätsparameter DSL zeigte für die Messungen aus Gruppe 1 eine stetig abfallende Tendenz von etwa 15 μm bis 13 μm . Nach anfänglichem leichtem Anstieg fielen auch die mittleren Werte aus Gruppe 2 und 3 stetig ab. Zu Beginn der Messungen lagen die Werte der vesikelhaltigen Proben über denjenigen der vesikelfreien, was sich aber bei der letzten Messung umkehrte. Die Spermien, denen vor dem Einfrieren Vesikel zugegeben worden waren, wiesen bis 10 Minuten nach dem Auftauen im Vergleich mit den anderen Gruppen die höchsten Werte auf. Für die Messwerte der Gruppen konnten signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen ($p=0,022$) und über die Zeit ($p=0,0001$) festgestellt werden. Graphisch erschienen die mittleren Werte von Behandlungsgruppe 2 verantwortlich für den signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

Tab. 14: Ergebnisse der Messung des CASA-Streckenparameters DSL ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) der Spermien in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm SD$ (μm)	Min. (μm)	Max. (μm)
Behandlung 1	0	10	15,26 ± 7,82	0,00	28,14
Behandlung 1	10	10	13,82 ± 6,62	4,46	24,80
Behandlung 1	30	10	12,79 ± 3,48	9,76	19,39
Behandlung 2	0	10	17,65 ± 4,77	10,21	24,18
Behandlung 2	10	10	19,16 ± 4,50	10,98	25,95
Behandlung 2	30	10	11,80 ± 6,21	0,00	23,65

Ergebnisse

Behandlung 3	0	10	15,42 ± 5,10	10,68	26,71
Behandlung 3	10	10	15,81 ± 7,01	8,58	29,52
Behandlung 3	30	10	10,74 ± 4,60	4,58	19,59

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

4.5.1.5 Die Geschwindigkeitsparameter (VAP, VCL, VSL)

4.5.1.5.1 VAP

Die vesikelfreien Spermienproben wiesen eine annähernd konstante Geschwindigkeit für den Messparameter VAP über die Zeit auf. Ein leichter Abfall der Geschwindigkeit bei 10 Minuten nach Messbeginn wurde von einem leichten Anstieg gefolgt, der die gemessenen gegen Ende des Versuches gemessenen Werte wieder mit den Ausgangswerten vergleichbar machte. Die Werte für den Parameter VAP aus Gruppe 2, wo die Vesikelzugabe zu den Spermien vor dem Einfriervorgang erfolgte, lagen bis 10 Minuten nach dem Auftauen deutlich höher als die Werte der anderen Gruppen und zeigten bis dahin einen Anstieg um etwa 9% relativ zum Ausgangswert. Die letzte Messung lieferte nach einem starken Abfall aber niedrigere Werte als bei Gruppe 1. Die Spermienproben aus Gruppe 3 zeigten ebenfalls bis 10 Minuten nach dem Auftauen einen leichten Anstieg der Geschwindigkeit (VAP) wiesen aber zu Beginn und am Ende die niedrigsten Werte auf. Die zweifaktorielle Varianzanalyse bestätigte die Signifikanz der Gruppenunterschiede ($p=0,0053$), für die wahrscheinlich die Messwerte der zweiten Gruppe verantwortlich ist, und die Signifikanz der Veränderung der Werte über die Zeit ($p=0,003$).

Tab. 15: Ergebnisse der Messung des CASA-Geschwindigkeitsparameters VAP ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) der Spermien in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm SD$ ($\mu\text{m/s}$)	Min. ($\mu\text{m/s}$)	Max. ($\mu\text{m/s}$)
Behandlung 1	0	10	43,88 ± 19,19	0,00	68,60
Behandlung 1	10	10	40,18 ± 16,33	13,97	63,07
Behandlung 1	30	10	42,76 ± 11,97	32,53	69,24

Ergebnisse

Behandlung 2	0	10	50,60 ± 8,72	37,02	62,00
Behandlung 2	10	10	55,01 ± 9,88	38,15	70,63
Behandlung 2	30	10	37,87 ± 16,89	0,00	63,41
Behandlung 3	0	10	43,01 ± 11,17	32,16	68,39
Behandlung 3	10	10	45,01 ± 15,79	28,04	75,66
Behandlung 3	30	10	33,29 ± 12,66	12,97	55,43

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

4.5.1.5.2 VCL

Die Messwerte des Motilitätsparameters VCL verhielten sich ähnlich wie diejenigen des Messparameters VAP. Die Spermien aus der reinen Spermienprobe zeigten jedoch nach einem initialen Abfall um etwa 9% (relativ zum Ausgangswert) einen deutlichen Anstieg der Geschwindigkeit bis 30 Minuten nach dem Auftauen auf den höchsten Endwert aller Gruppen. Sowohl Behandlung 2 als auch Behandlung 3 stiegen zwischen den ersten beiden Messzeitpunkten leicht an, um danach steil abzufallen. Bis zum Zeitpunkt 10 Minuten nach dem Auftauen wurde bei den Spermien, denen vor dem Einfrieren Vesikel zugesetzt worden waren, die höchste Geschwindigkeit (VCL) gemessen. Der Unterschied zwischen den Werten der einzelnen Behandlungen ist gemäß des Ergebnisses der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen signifikant ($p=0,0375$). Ursache dafür sind wahrscheinlich die mittleren Ergebnisse aus Gruppe 2.

Tab. 16: Ergebnisse der Messung des CASA-Geschwindigkeitsparameters VCL ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) der Spermien in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm SD$ ($\mu\text{m/s}$)	Min. ($\mu\text{m/s}$)	Max. ($\mu\text{m/s}$)
Behandlung 1	0	10	71,45 ± 30,27	0,00	101,12
Behandlung 1	10	10	65,36 ± 27,83	21,66	103,92
Behandlung 1	30	10	76,85 ± 25,40	47,1	116,75
Behandlung 2	0	10	80,96 ± 11,46	65,48	95,95
Behandlung 2	10	10	86,31 ± 10,92	72,79	108,9

Ergebnisse

Behandlung 2	30	10	70,87 ± 31,79	0,00	121,86
Behandlung 3	0	10	68,53 ± 17,23	49,48	105,4
Behandlung 3	10	10	73,67 ± 24,40	41,22	120,03
Behandlung 3	30	10	64,77 ± 26,07	26,53	110,74

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

4.5.1.5.3 VSL

Vesikelfreie Spermien zeigten im zeitlichen Verlauf eine Tendenz zum stetigen Abfall der Geschwindigkeit (VSL), während bei Spermien mit Vesikelzusatz bis 10 Minuten nach dem Auftauen ein Anstieg der Messwerte zu bemerken war. Wie bereits zuvor zeigten auch hier die Spermien, die schon vor dem Einfrieren mit Vesikeln versetzt worden waren, im ersten Zeitabschnitt des Versuchs bis 10 Minuten nach Beginn die höchsten Werte, die aber anschließend bis Messende auf Werte unterhalb derjenigen der reinen Spermienproben abfielen. Die zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen lieferte sowohl für die Unterschiede zwischen den Behandlungsarten ($p=0,0112$) als auch über die Zeit ($p=0,0002$) signifikante Ergebnisse. Auslöser für den Unterschied zwischen den Behandlungen sind erneut wahrscheinlich die Werte aus Behandlungsgruppe 2.

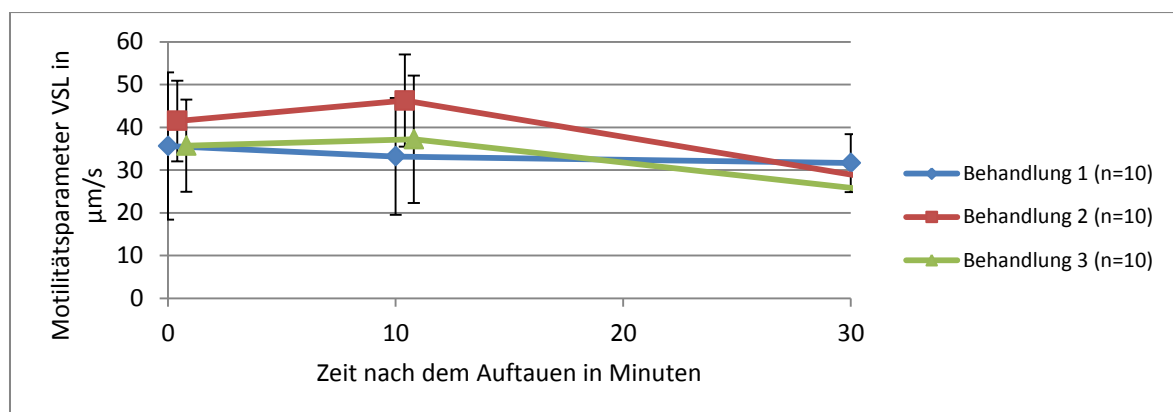


Abb. 21: Veränderung des Motilitätsparameters VSL in den Spermienproben in Abhängigkeit der drei verschiedenen Behandlungen über die Zeit.

Dargestellt als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) mit positivem und negativem Fehlerbalken (SD; Standardabweichung); Behandlung 1: vesikelfreie Spermienproben, Behandlung 2: Zugabe

von Vesikeln zu den Spermien vor dem Einfrieren, Behandlung 3: Zugabe von Vesikeln zu den Spermien nach dem Auftauen, n= Anzahl der Proben

4.5.1.6 STR

Die Messwerte für den Parameter STR, der Quotient aus den Parametern VSL und VAP, waren über die Zeit für die Spermien ohne Vesikelkontakt fast konstant. Obwohl hier im Vergleich der niedrigste Anfangswert gemessen wurde, zeigten die Spermien den höchsten Endwert. Einzig die Messwerte aus Gruppe 2 zeigten bis 10 Minuten nach dem Auftauen einen geringgradigen Anstieg und lagen relativ gesehen bis dahin auf höchstem Niveau, fielen dann aber wieder unter das Niveau der Werte aus Gruppe 1 ab. Gruppe 3 dagegen zeigte stetig abfallende Werte bis zum Untersuchungsende. Der Unterschied zwischen den Messwerten über die Zeit ($p=0,031$) war signifikant.

Tab. 17: Ergebnisse der Messung des CASA-Parameters STR ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) der Spermien in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Max.
Behandlung 1	0	10	$0,72 \pm 0,26$	0,00	0,89
Behandlung 1	10	10	$0,74 \pm 0,17$	0,43	0,86
Behandlung 1	30	10	$0,75 \pm 0,06$	0,65	0,85
Behandlung 2	0	10	$0,81 \pm 0,05$	0,71	0,87
Behandlung 2	10	10	$0,83 \pm 0,05$	0,70	0,90
Behandlung 2	30	10	$0,67 \pm 0,25$	0,00	0,84
Behandlung 3	0	10	$0,82 \pm 0,04$	0,75	0,88
Behandlung 3	10	10	$0,76 \pm 0,13$	0,41	0,88
Behandlung 3	30	10	$0,70 \pm 0,13$	0,40	0,82

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

4.5.1.7 LIN

Die reine Spermienprobe zeigte für den Parameter LIN (=VSL/VCL) relativ konstante Messwerte. Die Spermien aus Gruppe 2 zeigten bis zur zweiten Messung nach 10 Minuten eine geringgradig ansteigende Tendenz mit nachfolgendem Abfall unter den Wert der Spermien aus Gruppe 1. Die dritte Gruppe lieferte stetig abfallende Werte, die bei der letzten Messung nach 30 Minuten ähnlich denjenigen der zweiten Gruppe waren. Der Unterschied der Messwerte über den zeitlichen Verlauf war signifikant ($p=0,0012$).

Tab. 18: Ergebnisse der Messung des CASA-Parameters LIN ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) der Spermien in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Max.
Behandlung 1	0	10	$0,45 \pm 0,19$	0,00	0,67
Behandlung 1	10	10	$0,46 \pm 0,11$	0,29	0,61
Behandlung 1	30	10	$0,44 \pm 0,08$	0,34	0,59
Behandlung 2	0	10	$0,51 \pm 0,06$	0,41	0,57
Behandlung 2	10	10	$0,53 \pm 0,08$	0,37	0,65
Behandlung 2	30	10	$0,37 \pm 0,17$	0,00	0,57
Behandlung 3	0	10	$0,52 \pm 0,06$	0,43	0,63
Behandlung 3	10	10	$0,47 \pm 0,09$	0,30	0,56
Behandlung 3	30	10	$0,37 \pm 0,11$	0,20	0,55

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

4.5.1.8 WOB

Die Verhältnisse, die die Werte der unterschiedlichen Gruppen hinsichtlich des Parameters WOB (VAP/VCL) zeigten, gleichen den Verhältnissen, die beim Parameter LIN im vorhergehenden Abschnitt dargestellt wurden, d.h. die Werte aus Behandlung 1 sind über den zeitlichen Verlauf beinahe konstant. Dagegen zeigten die Spermien mit Vesikelzusatz vor dem Einfriervorgang, die bis 10 Minuten nach der ersten Messung die höchsten Werte aufwiesen, zunächst geringgradig ansteigende Tendenz und im Anschluss einen Abfall auf ein

Werteniveau unter dem der Gruppe 1. Die Spermien, die erst nach dem Auftauen mit Vesikel versetzt wurden, zeigten wiederum einen stetigen Abfall auf ähnliche Endwerte wie Gruppe 2. Rechnerisch konnte ein signifikanter Unterschied der Daten über die Zeit bestätigt werden ($p=0,0025$).

Tab. 19: Ergebnisse der Messung des CASA-Parameters WOB ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) der Spermien in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Max.
Behandlung 1	0	10	$0,56 \pm 0,22$	0,00	0,81
Behandlung 1	10	10	$0,56 \pm 0,13$	0,32	0,70
Behandlung 1	30	10	$0,57 \pm 0,07$	0,47	0,70
Behandlung 2	0	10	$0,62 \pm 0,05$	0,55	0,69
Behandlung 2	10	10	$0,63 \pm 0,06$	0,52	0,73
Behandlung 2	30	10	$0,49 \pm 0,20$	0,00	0,67
Behandlung 3	0	10	$0,63 \pm 0,05$	0,56	0,71
Behandlung 3	10	10	$0,57 \pm 0,09$	0,36	0,63
Behandlung 3	30	10	$0,48 \pm 0,12$	0,24	0,67

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

4.5.1.9 ALH und BCF

Die Ergebnisse für die CASA-Parameter ALH und BCF der einzelnen Gruppen sind in den Tab. 20 und 21 dargestellt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Tab. 20: Ergebnisse der Messung des CASA-Parameters ALH ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) der Spermien in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm SD$ (μm)	Min. (μm)	Max. (μm)
Behandlung 1	0	10	$4,36 \pm 2,78$	0,00	10,72

Ergebnisse

Behandlung 1	10	10	3,90 ± 1,02	1,61	5,17
Behandlung 1	30	10	4,85 ± 1,25	3,98	8,32
Behandlung 2	0	10	4,17 ± 0,76	3,02	5,59
Behandlung 2	10	10	4,47 ± 2,09	0,62	8,97
Behandlung 2	30	10	4,25 ± 2,04	0,00	8,35
Behandlung 3	0	10	4,71 ± 1,29	3,21	7,98
Behandlung 3	10	10	4,33 ± 0,77	3,06	5,43
Behandlung 3	30	10	4,03 ± 0,73	2,59	5,23

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

Tab. 21: Ergebnisse der Messung des CASA-Parameters BCF ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) der Spermien in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm SD$ (Hz)	Min. (Hz)	Max. (Hz)
Behandlung 1	0	10	19,76 ± 7,78	0,00	28,50
Behandlung 1	10	10	16,19 ± 6,60	8,29	23,66
Behandlung 1	30	10	19,33 ± 5,57	11,77	31,18
Behandlung 2	0	10	21,36 ± 2,15	18,76	25,62
Behandlung 2	10	10	20,47 ± 1,65	18,19	23,17
Behandlung 2	30	10	20,08 ± 9,74	0,00	36,52
Behandlung 3	0	10	20,18 ± 4,94	9,39	26,05
Behandlung 3	10	10	19,55 ± 5,40	8,26	24,93
Behandlung 3	30	10	17,95 ± 5,66	8,52	24,16

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

4.5.1.10 HOS-Test

Die Messungen des HOS-Testes erfolgten nur jeweils zu Beginn und am Ende der Versuchsdurchführung. Gemessen wurde der prozentuale Anteil an membranintakten

(„curled“) Spermien. Während für die vesikelfreien Spermienproben sowie für die Spermienproben, die vor dem Einfriervorgang mit Vesikel versetzt worden waren, die Werte relativ ähnlich waren und eine leicht abfallende Tendenz zeigten (etwa 80% auf etwa 77%), wiesen die Spermien, die zu Messbeginn erstmalig Vesikelkontakt hatten, zunächst den höchsten Anteil an membranintakten Spermien (83%) auf. Diese letzte Gruppe zeigte jedoch im Zeitverlauf den stärksten Abfall. Der Unterschied der Messwerte über die Zeit war signifikant ($p=0,0047$).

Tab. 22: Ergebnisse der Messung des prozentualen Anteils membranintakter Spermien ($\bar{x} \pm$ SD, Min., Max.) mittels HOS-Test in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm$ SD (%)	Min. (%)	Max. (%)
Behandlung 1	0	10	79,35 \pm 7,99	68,00	90,00
Behandlung 1	30	10	77,60 \pm 7,38	67,00	87,00
Behandlung 2	0	10	80,95 \pm 7,15	66,00	89,00
Behandlung 2	30	10	77,30 \pm 9,79	56,00	87,00
Behandlung 3	0	10	82,75 \pm 7,12	67,00	91,00
Behandlung 3	30	10	72,50 \pm 12,64	48,50	85,50

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm$ SD= arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

4.5.1.11 Eosinfärbung (Lebend/Tot-Verhältnis)

Die Messungen bezüglich des Anteils der lebenden Spermienzellen innerhalb der Proben fanden nur zum Zeitpunkt 0 und 30 Minuten nach dem Auftauen statt. Hinsichtlich der Anfangswerte unterschied sich Gruppe 2 (49%) deutlich von den Werten aus Gruppe 1 und 3 (62 bzw. 59%). Alle Gruppen zeigten einen Abfall der Werte über die Zeit, der in Abb. 22 zu sehen ist. Der Unterschied der Werte zwischen den Gruppen ($p=0,0005$) und über die Zeit war signifikant ($p \leq 0,0001$).

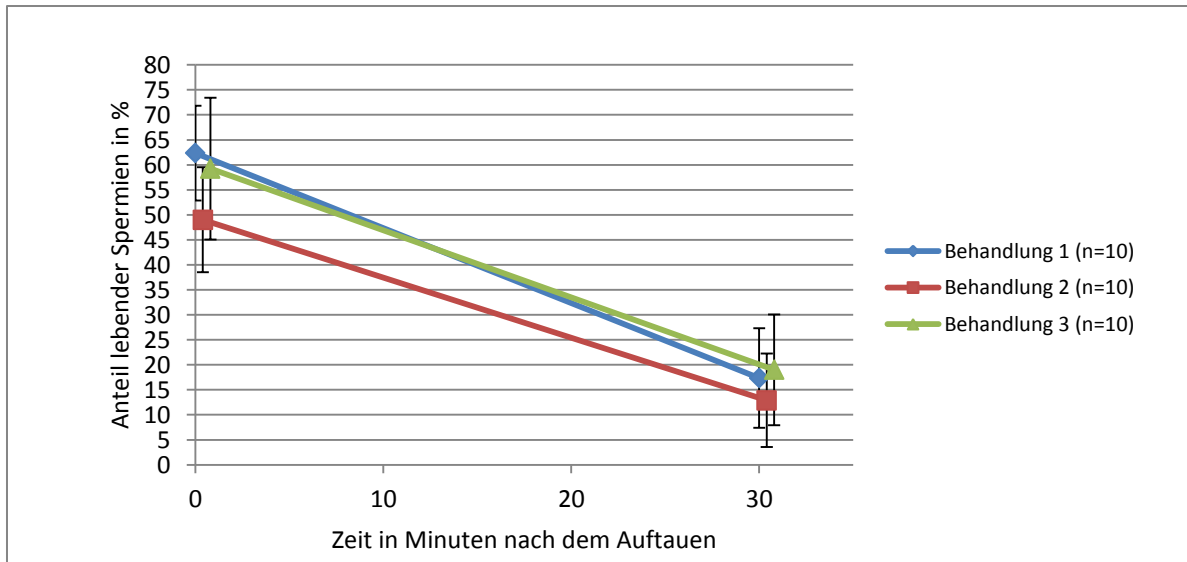


Abb. 22: Veränderung des Anteils der lebenden Spermien in den Spermienproben in Abhängigkeit der drei verschiedenen Behandlungen über die Zeit.

Dargestellt als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) mit positivem und negativem Fehlerbalken (SD; Standardabweichung); Behandlung 1: vesikelfreie Spermienproben, Behandlung 2: Zugabe von Vesikeln zu den Spermien vor dem Einfrieren, Behandlung 3: Zugabe von Vesikeln zu den Spermien nach dem Auftauen, n= Anzahl der Proben

4.5.1.12 Pathomorphologie

Die Beurteilung des prozentualen Anteils morphologisch veränderter Spermien erfolgte 0 und 30 Minuten nach dem Auftauen. Die Ergebnisse wurden in Gruppen zusammengefasst und ausgewertet.

Der Anteil an morphologisch unveränderten Spermien war in allen drei Gruppen über die Zeit relativ konstant und befand sich auf ähnlichem Niveau (Tab. 23). Der höchste prozentuale Anteil an morphologisch unauffälligen Zellen war in den vesikelfreien Proben nachweisbar, allerdings waren die Unterschiede nur gering und zwischen den Gruppen oder über die Zeit nicht signifikant.

Tab. 23: Prozentualer Anteil morphologisch unauffälliger Spermien ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) im Spermac®-Ausstrich in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm SD$ (%)	Min. (%)	Max. (%)
Behandlung 1	0	10	83,30 \pm 7,87	66,00	94,00

Ergebnisse

Behandlung 1	30	10	85,15 ± 8,14	69,00	95,00
Behandlung 2	0	10	79,35 ± 16,62	39,00	94,00
Behandlung 2	30	10	79,25 ± 8,30	65,00	89,50
Behandlung 3	0	10	80,40 ± 8,81	59,00	90,00
Behandlung 3	30	10	80,45 ± 10,83	55,00	95,00

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

Ähnlich unterschieden sich die Anteile an morphologisch veränderten Spermien zwischen den Gruppen bzw. über die Zeit nicht. Die Tab. 24-28 geben die Ergebnisse bezüglich des Anteils an losen Köpfen, Akrosom-, Kopf- und Geißeldefekten sowie Zytoplasmotropfen wieder.

Tab. 24: Prozentualer Anteil an losen Spermienköpfen ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) im Spermac®-Ausstrich in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm SD$ (%)	Min. (%)	Max. (%)
Behandlung 1	0	10	1,30 ± 2,21	0,00	7,00
Behandlung 1	30	10	1,30 ± 2,30	0,00	7,00
Behandlung 2	0	10	0,50 ± 1,08	0,00	3,00
Behandlung 2	30	10	0,75 ± 0,95	0,00	2,50
Behandlung 3	0	10	0,83 ± 2,00	0,00	6,00
Behandlung 3	30	10	1,20 ± 1,11	0,00	3,00

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

Tab. 25: Prozentualer Anteil an Akrosomdefekten der Spermien ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) im Spermac®-Ausstrich in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm SD$ (%)	Min. (%)	Max. (%)
Behandlung 1	0	10	0,25 \pm 0,36	0,00	1,00
Behandlung 1	30	10	0,40 \pm 0,61	0,00	1,50
Behandlung 2	0	10	0,10 \pm 0,32	0,00	1,00
Behandlung 2	30	10	0,30 \pm 0,63	0,00	2,00
Behandlung 3	0	10	0,10 \pm 0,21	0,00	0,50
Behandlung 3	30	10	0,30 \pm 0,35	0,00	1,00

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

Tab. 26: Prozentualer Anteil an Kopfdefekten der Spermien ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) im Spermac®-Ausstrich in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm SD$ (%)	Min. (%)	Max. (%)
Behandlung 1	0	10	0,15 \pm 0,34	0,00	1,00
Behandlung 1	30	10	0,05 \pm 0,16	0,00	0,50
Behandlung 2	0	10	0,00 \pm 0,00	0,00	0,00
Behandlung 2	30	10	0,05 \pm 0,16	0,00	0,50
Behandlung 3	0	10	0,00 \pm 0,00	0,00	0,00
Behandlung 3	30	10	0,00 \pm 0,00	0,00	0,00

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

Tab. 27: Prozentualer Anteil an Geißeldefekten der Spermien ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) im Spermac®-Ausstrich in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm SD$ (%)	Min. (%)	Max. (%)
Behandlung 1	0	10	14,75 \pm 7,14	5,50	31,50
Behandlung 1	30	10	13,10 \pm 6,92	5,00	27,00
Behandlung 2	0	10	19,70 \pm 16,85	6,00	61,00
Behandlung 2	30	10	19,45 \pm 7,74	8,50	34,50
Behandlung 3	0	10	18,65 \pm 9,05	10,00	41,00
Behandlung 3	30	10	18,00 \pm 10,24	5,00	43,00

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

Tab. 28: Prozentualer Anteil an Spermien mit Zytoplasmotropfen ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) im Spermac®-Ausstrich in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm SD$ (%)	Min. (%)	Max. (%)
Behandlung 1	0	10	0,25 \pm 0,26	0,00	0,50
Behandlung 1	30	10	0,00 \pm 0,00	0,00	0,00
Behandlung 2	0	10	0,35 \pm 0,47	0,00	1,00
Behandlung 2	30	10	0,20 \pm 0,35	0,00	1,00
Behandlung 3	0	10	0,10 \pm 0,21	0,00	0,50
Behandlung 3	30	10	0,05 \pm 0,16	0,00	0,50

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

4.5.2 Tiefgefrierversuch Teil 2

Im zweiten Teil des Versuches mit Tiefgefriersperma wurden wiederum drei verschiedene Gruppen gebildet. Diese unterschieden sich allerdings im Gegensatz zu diejenigen im vorhergehenden Teil ausschließlich hinsichtlich der zugegebenen Vesikelmenge, während

der Zugabezeitpunkt bei allen Gruppen gleich war und nach dem Auftauvorgang geschah. Ziel war es, einen eventuellen Einfluss der Vesikelkonzentration auf den vesikulären Effekt zu untersuchen. Der ersten Gruppe („Behandlung 1“) wurden zu Zeitpunkt 0 Vesikel in einer Vesikelprotein-Konzentration von 0,05 mg/ml zugegeben. Die Konzentrationen an Vesikelprotein in den Gruppen 2 und 3 wurden auf 0,1 mg/ml bzw. 0,2 mg/ml eingestellt.

4.5.2.1 Subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit

Die subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit zeigte in ihrem zeitlichen Verlauf Unterschiede zwischen den einzelnen Vesikelkonzentrationen (Abb. 23). Zu Beginn lagen die mittleren prozentualen Werte der subjektiv geschätzten Vorwärtsbeweglichkeit aller drei Gruppen sehr eng beieinander. Bei der zweiten Messung nach 10 Minuten wichen die mittleren Messwerte jedoch auseinander. Während die Spermienproben aus Behandlung 1 (0,05 mg Vesikelprotein/ml) den höchsten mittleren Wert bei etwa 18% aufwiesen, zeigten die Werte aus Gruppe 2 (0,1 mg Vesikelprotein/ml) und Gruppe 3 (0,2 mg Vesikelprotein/ml) einen um 15% bzw. 30% niedrigeren Wert relativ zum Mittelwert aus Gruppe 1. Die Unterschiede der mittleren Messwerte über die Zeit ($p \leq 0,0001$) waren signifikant. Außerdem konnte bei der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen ein signifikantes Ergebnis für die Wechselwirkung zwischen Behandlung und Zeit ermittelt werden ($p=0,0176$).

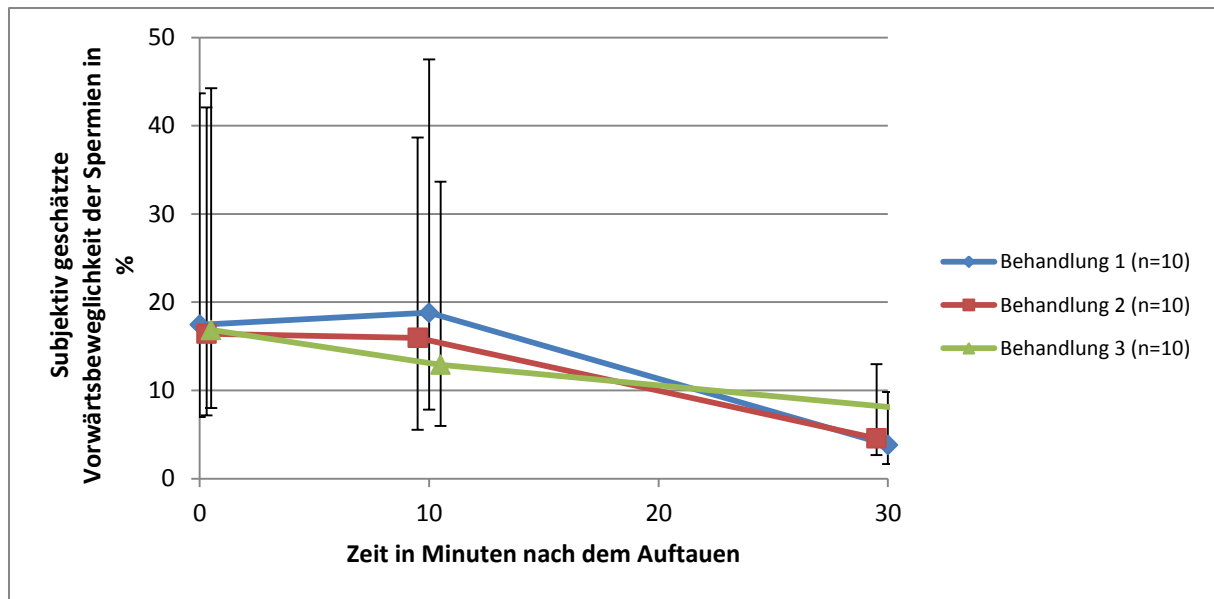


Abb. 23: Veränderung des prozentualen Anteils der subjektiv geschätzten Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien in Abhängigkeit der drei verschiedenen Behandlungen über die Zeit.

Dargestellt als modifizierter Mittelwert (\bar{x}_{mod}) mit positivem und negativem Fehlerbalken (1-s-Bereich); Behandlung 1: Spermienproben mit Vesikelzusatz 0,05 mg Vesikelprotein/ml, Behandlung 2: Spermienproben mit Vesikelzusatz 0,1 mg Vesikelprotein/ml, Behandlung 3: Spermienproben mit Vesikelzusatz 0,2 mg Vesikelprotein/ml, n= Anzahl der Proben

4.5.2.2 Gesamtmotilität (CASA)

Der CASA-Parameter der prozentualen Gesamtmotilität der Spermien zeigte für alle Gruppen eine über den Messungsverlauf kontinuierlich abfallende Tendenz (Tab. 29). Im Zeitraum bis 10 Minuten nach Messbeginn unterschieden sich die arithmetischen Mittel der Messwerte aus den drei Behandlungsgruppen kaum voneinander. Erst nach der letzten Messung konnte eine Abweichung des mittleren Messwertes der Spermienproben mit 0,05 mg Vesikelprotein/ml Zusatz (41%) von den anderen beiden Gruppen mit höherem Vesikelgehalt (45%) festgestellt werden. Der Unterschied der mittleren Messwerte über die Zeit war signifikant ($p=0,0345$).

Tab. 29: Prozentuale Gesamtmotilität der Spermien ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) in Abhängigkeit von zugegebener Vesikelkonzentration über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm SD$ (%)	Min. (%)	Max. (%)
Behandlung 1	0	10	49,62 \pm 14,25	23,74	69,41
Behandlung 1	10	10	45,56 \pm 13,72	18,21	64,59
Behandlung 1	30	10	40,73 \pm 16,59	13,61	61,08
Behandlung 2	0	10	48,85 \pm 13,64	22,71	62,95
Behandlung 2	10	10	45,51 \pm 14,82	17,96	64,76
Behandlung 2	30	10	45,03 \pm 16,79	17,69	68,57
Behandlung 3	0	10	49,93 \pm 16,96	15,62	67,63
Behandlung 3	10	10	45,85 \pm 18,13	20,30	71,42
Behandlung 3	30	10	45,01 \pm 18,71	15,63	63,01

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

4.5.2.3 Progressive Motilität (CASA)

Die progressive Beweglichkeit im CASA ähnelte der subjektiv geschätzten Vorwärtsbeweglichkeit (Abb. 24). Rechnerisch wurde eine Signifikanz bezüglich der Wechselwirkung der Faktoren Zeit und Behandlungsart deutlich ($p=0,0072$).

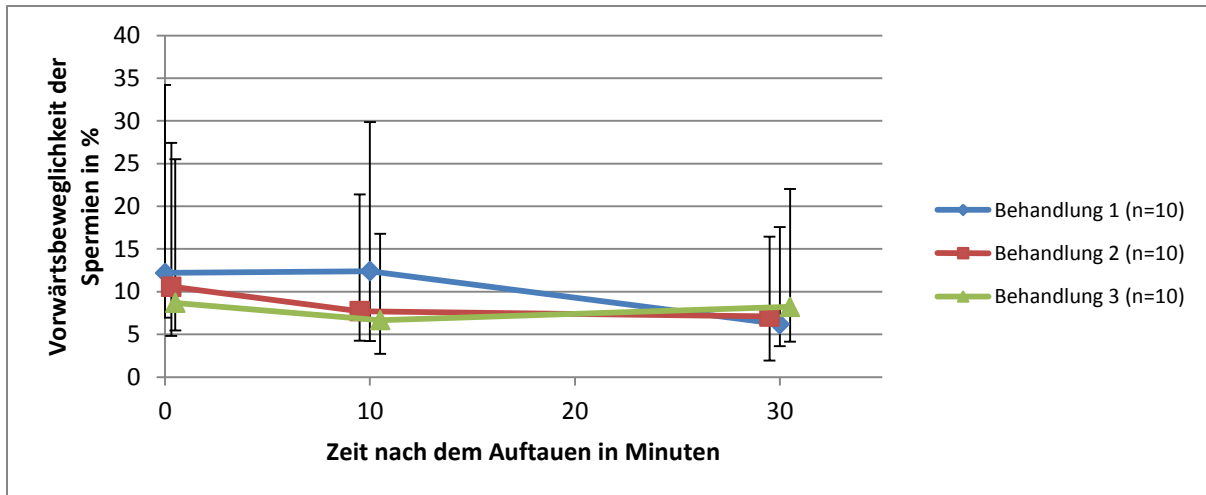


Abb. 24: Veränderung des prozentualen Anteils der computer-geschätzten Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien in Abhängigkeit der drei verschiedenen Behandlungen über die Zeit.

Dargestellt als modifizierter Mittelwert (\bar{x}_{mod}) mit positivem und negativem Fehlerbalken (1-s-Bereich); Behandlung 1: Spermienproben mit Vesikelzusatz 0,05 mg Vesikelprotein/ml, Behandlung 2: Spermienproben mit Vesikelzusatz 0,1 mg Vesikelprotein/ml, Behandlung 3: Spermienproben mit Vesikelzusatz 0,2 mg Vesikelprotein/ml, n= Anzahl der Proben

4.5.2.4 CASA-Streckenparameter: DAP, DSL, DCL

Die durchschnittlichen Messwerte bezüglich der CASA-Streckenparameter DAP, DSL und DCL sind in den Tab. 30-32 wiedergegeben. Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergab einen signifikanten Unterschied über die Zeit für DAP ($p=0,026$) und DSL ($p=0,0093$), jedoch nicht für DCL.

Tab. 30: Ergebnisse der Messung des CASA-Streckenparameters DAP ($\bar{x} \pm \text{SD}$, Min., Max.) in Abhängigkeit von der zugegebenen Vesikelkonzentration über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm \text{SD} (\mu\text{m})$	Min. (μm)	Max. (μm)
Behandlung 1	0	10	$18,58 \pm 5,11$	13,03	27,51
Behandlung 1	10	10	$18,84 \pm 5,47$	14,22	32,30
Behandlung 1	30	10	$15,07 \pm 5,41$	4,69	25,68
Behandlung 2	0	10	$19,55 \pm 6,24$	13,09	33,52
Behandlung 2	10	10	$18,80 \pm 7,58$	11,26	34,58

Ergebnisse

Behandlung 2	30	10	15,41 ± 3,74	11,52	23,57
Behandlung 3	0	10	17,68 ± 6,73	6,13	29,34
Behandlung 3	10	10	18,39 ± 6,21	12,69	30,78
Behandlung 3	30	10	16,83 ± 3,54	14,18	25,06

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

Tab. 31: Ergebnisse der Messung des CASA-Streckenparameters DCL ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) in Abhängigkeit von der zugegebenen Vesikelkonzentration über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm SD$ (µm)	Min. (µm)	Max. (µm)
Behandlung 1	0	10	31,19 ± 6,99	22,59	41,62
Behandlung 1	10	10	35,20 ± 9,93	24,68	56,47
Behandlung 1	30	10	27,16 ± 11,70	6,93	49,9
Behandlung 2	0	10	31,55 ± 8,75	21,73	48,86
Behandlung 2	10	10	32,78 ± 11,74	20,23	54,27
Behandlung 2	30	10	29,82 ± 9,95	16,29	47,41
Behandlung 3	0	10	30,72 ± 11,75	8,57	48,06
Behandlung 3	10	10	30,95 ± 11,76	18,92	50,78
Behandlung 3	30	10	31,47 ± 7,62	22,74	46,31

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

Tab. 32: Ergebnisse der Messung des CASA-Streckenparameters DSL ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) in Abhängigkeit von der zugegebenen Vesikelkonzentration über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm SD$ (µm)	Min. (µm)	Max. (µm)
Behandlung 1	0	10	14,68 ± 5,18	10,54	24,36
Behandlung 1	10	10	14,34 ± 5,57	9,60	27,63
Behandlung 1	30	10	11,13 ± 4,26	3,99	20,74
Behandlung 2	0	10	16,06 ± 6,18	9,08	30,06

Ergebnisse

Behandlung 2	10	10	15,04 ± 7,47	6,76	31,24
Behandlung 2	30	10	11,36 ± 3,16	8,60	18,97
Behandlung 3	0	10	14,03 ± 5,91	5,21	24,96
Behandlung 3	10	10	14,92 ± 5,66	9,32	27,11
Behandlung 3	30	10	12,40 ± 2,82	9,69	19,34

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

4.5.2.5 Geschwindigkeitsparameter: VAP, VCL, VSL

Die Ergebnisse für VAP, VCL und VSL sind in den Tab. 33-35 dargestellt. Die zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung ergab signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen über die Zeit für VSL ($p=0,0144$), eine Tendenz für VAP ($p=0,0528$), jedoch nicht für VCL.

Tab. 33: Ergebnisse der Messung des CASA-Geschwindigkeitsparameters VAP ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) in Abhängigkeit von der zugegebenen Vesikelkonzentration über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm SD$ ($\mu\text{m/s}$)	Min. ($\mu\text{m/s}$)	Max. ($\mu\text{m/s}$)
Behandlung 1	0	10	44,21 \pm 10,58	32,08	61,37
Behandlung 1	10	10	44,60 \pm 11,75	32,33	72,95
Behandlung 1	30	10	36,47 \pm 11,98	10,06	57,07
Behandlung 2	0	10	46,24 \pm 13,12	32,75	75,66
Behandlung 2	10	10	43,95 \pm 15,65	28,77	76,41
Behandlung 2	30	10	37,69 \pm 6,79	29,80	51,98
Behandlung 3	0	10	41,56 \pm 15,35	12,69	67,97
Behandlung 3	10	10	43,23 \pm 12,30	29,19	67,27
Behandlung 3	30	10	40,85 \pm 6,65	35,16	55,57

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

Tab. 34: Ergebnisse der Messung des CASA-Geschwindigkeitsparameters VCL ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) in Abhängigkeit von der zugegebenen Vesikelkonzentration über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm SD$ ($\mu\text{m/s}$)	Min. ($\mu\text{m/s}$)	Max. ($\mu\text{m/s}$)
Behandlung 1	0	10	73,95 \pm 14,65	53,62	92,79
Behandlung 1	10	10	82,31 \pm 21,62	57,31	126,98
Behandlung 1	30	10	64,29 \pm 25,55	14,85	110,14
Behandlung 2	0	10	73,80 \pm 18,46	48,89	109,74
Behandlung 2	10	10	76,40 \pm 24,38	52,22	122,00
Behandlung 2	30	10	71,82 \pm 20,23	42,49	103,17
Behandlung 3	0	10	71,85 \pm 26,40	17,74	109,71
Behandlung 3	10	10	72,22 \pm 23,43	42,24	110,14
Behandlung 3	30	10	75,46 \pm 14,67	58,71	101,86

Ergebnisse

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

Tab. 35: Ergebnisse der Messung des CASA-Geschwindigkeitsparameters VSL ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) in Abhängigkeit von der zugegebenen Vesikelkonzentration über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm SD$ (µm/s)	Min. (µm/s)	Max. (µm/s)
Behandlung 1	0	10	34,86 \pm 10,76	25,22	54,43
Behandlung 1	10	10	33,97 \pm 11,94	21,84	62,04
Behandlung 1	30	10	27,10 \pm 9,31	8,56	46,13
Behandlung 2	0	10	38,03 \pm 13,14	23,02	67,89
Behandlung 2	10	10	35,21 \pm 15,58	17,26	68,97
Behandlung 2	30	10	27,93 \pm 5,64	23,37	41,94
Behandlung 3	0	10	32,90 \pm 13,33	10,78	57,71
Behandlung 3	10	10	35,01 \pm 11,30	24,98	59,10
Behandlung 3	30	10	30,28 \pm 5,60	23,01	43,04

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

4.5.2.6 Weitere CASA-Parameter: STR, LIN, WOB, ALH, BCF

In den Tab. 36-40 sind die Ergebnisse für die CASA-Parameter STR, LIN, WOB, ALH und BCF dargestellt. Der Unterschied der Mittelwerte über die Zeit war hierbei signifikant für STR ($p=0,0101$) und LIN ($p=0,0161$), jedoch nicht für die übrigen Parameter.

Tab. 36: Ergebnisse der Messung des CASA-Parameters STR ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) in Abhängigkeit von der zugegebenen Vesikelkonzentration über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Max.
Behandlung 1	0	10	0,78 \pm 0,10	0,56	0,88
Behandlung 1	10	10	0,74 \pm 0,07	0,66	0,85

Ergebnisse

Behandlung 1	30	10	0,70 ± 0,11	0,43	0,8
Behandlung 2	0	10	0,80 ± 0,06	0,70	0,89
Behandlung 2	10	10	0,78 ± 0,08	0,60	0,90
Behandlung 2	30	10	0,74 ± 0,06	0,62	0,81
Behandlung 3	0	10	0,74 ± 0,13	0,42	0,85
Behandlung 3	10	10	0,80 ± 0,05	0,72	0,88
Behandlung 3	30	10	0,74 ± 0,08	0,63	0,86

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

Tab. 37: Ergebnisse der Messung des CASA-Parameters LIN ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) in Abhängigkeit von der zugegebenen Vesikelkonzentration über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Max.
Behandlung 1	0	10	0,47 ± 0,09	0,33	0,58
Behandlung 1	10	10	0,41 ± 0,09	0,25	0,52
Behandlung 1	30	10	0,41 ± 0,07	0,29	0,51
Behandlung 2	0	10	0,51 ± 0,07	0,41	0,61
Behandlung 2	10	10	0,45 ± 0,08	0,28	0,58
Behandlung 2	30	10	0,40 ± 0,09	0,29	0,55
Behandlung 3	0	10	0,44 ± 0,08	0,30	0,55
Behandlung 3	10	10	0,49 ± 0,07	0,41	0,61
Behandlung 3	30	10	0,41 ± 0,09	0,31	0,62

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

Tab. 38: Ergebnisse der Messung des CASA-Parameters WOB ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) in Abhängigkeit von der zugegebenen Vesikelkonzentration über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Max.
Behandlung 1	0	10	0,60 \pm 0,05	0,49	0,66
Behandlung 1	10	10	0,55 \pm 0,09	0,37	0,66
Behandlung 1	30	10	0,55 \pm 0,09	0,34	0,69
Behandlung 2	0	10	0,62 \pm 0,05	0,54	0,71
Behandlung 2	10	10	0,57 \pm 0,06	0,46	0,65
Behandlung 2	30	10	0,54 \pm 0,09	0,43	0,70
Behandlung 3	0	10	0,55 \pm 0,08	0,36	0,65
Behandlung 3	10	10	0,61 \pm 0,07	0,54	0,73
Behandlung 3	30	10	0,55 \pm 0,07	0,47	0,71

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

Tab. 39: Ergebnisse der Messung des CASA-Streckenparameters ALH ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) in Abhängigkeit von der zugegebenen Vesikelkonzentration über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm SD$ (μm)	Min. (μm)	Max. (μm)
Behandlung 1	0	10	4,18 \pm 0,73	3,03	5,37
Behandlung 1	10	10	4,68 \pm 0,75	3,24	5,60
Behandlung 1	30	10	4,14 \pm 1,13	1,52	5,45
Behandlung 2	0	10	4,26 \pm 0,99	2,89	6,25
Behandlung 2	10	10	4,70 \pm 0,75	3,54	6,21
Behandlung 2	30	10	4,60 \pm 0,80	3,35	6,04
Behandlung 3	0	10	4,34 \pm 1,05	2,03	5,28
Behandlung 3	10	10	4,56 \pm 0,64	3,60	5,80
Behandlung 3	30	10	4,83 \pm 1,07	3,28	7,37

Ergebnisse

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

Tab. 40: Ergebnisse der Messung des CASA-Streckenparameters BCF ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) in Abhängigkeit von der zugegebenen Vesikelkonzentration über die Zeit

Behandlungsart	T	n	$\bar{x} \pm SD$ (Hz)	Min. (Hz)	Max. (Hz)
Behandlung 1	0	10	20,42 \pm 3,38	16,38	25,46
Behandlung 1	10	10	21,26 \pm 3,22	15,15	25,31
Behandlung 1	30	10	18,90 \pm 4,26	12,15	25,74
Behandlung 2	0	10	21,39 \pm 3,21	17,83	28,99
Behandlung 2	10	10	20,42 \pm 2,88	15,57	26,07
Behandlung 2	30	10	18,15 \pm 2,81	13,55	21,25
Behandlung 3	0	10	19,11 \pm 6,45	7,02	25,38
Behandlung 3	10	10	19,83 \pm 4,74	9,56	24,03
Behandlung 3	30	10	20,16 \pm 2,78	16,90	25,49

T= Zeitpunkt der Messung nach dem Auftauen in Minuten; n= Anzahl der Probanden pro Gruppe; $\bar{x} \pm SD$ = arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; Min.= Minimum; Max.= Maximum

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Forschungsarbeit war die Beschreibung grundlegender Merkmale vesikulärer Strukturen aus dem caninen Ejakulat. Dies umfasste zum einen die ultrastrukturelle Darstellung mittels Transelektronenmikroskopie zur Erfassung der vesikulären Morphologie, wobei Ergebnisse von fertilen und infertilen Probanden verglichen wurden. Zum anderen sollte ein erster Überblick über die biochemische Zusammensetzung der seminalen Partikel mittels gängiger Verfahren der Protein- und Lipidanalyse gewonnen werden. Darüber hinaus erfolgte eine Untersuchung der Spermien-Vesikel-Interaktion. Hier war der Forschungsfokus auf die Ermittlung der vesikulären Wirkung hinsichtlich fertilitätsrelevanter Eigenschaften der Keimzellen gerichtet. Die Untersuchungen zur Interaktion zwischen den genannten Strukturen fanden an Tiefgefriersperma von gesunden Rüden statt. Dies geschah mit dem Ziel, eine eventuelle Möglichkeit des Einsatzes von Vesikeln als natürliche, körpereigene, fertilitätsfördernde Substanzen in der täglichen Besamungspraxis abzuklären. Dabei wurden relevante Eigenschaften von vesikelfreien Spermienproben, von solchen mit Vesikelzusatz vor dem Einfriervorgang als auch nach dem Auftauen verglichen. Außerdem wurde eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit der Vesikelwirkung auf die Spermienmotilitätseigenschaften untersucht.

5.1 Diskussion der Fragestellung

Vesikuläre Strukturen, die im Seminalplasma vorkommen, wurden erstmals 1968 in Kaninchensperma (Metz et al. 1968) erwähnt. Nach und nach folgten Beschreibungen in Ejakulaten anderer Spezies, darunter Mensch (Ronquist et al. 1978a), Bulle (Agrawal und Vanha-Perttula 1986), Schaf (Breitbart und Rubinstein 1982), Pferd (Arienti et al. 1998), Schwein (Piehl et al. 2006 May), Ratte (Fornes et al. 1991), Maus (Rejraji und Drevet 2003) und Hamster (Yanagimachi et al. 1985).

Vor allem beim Menschen sind morphologische, biochemische und funktionale Aspekte der Vesikel mittlerweile sehr gut untersucht und man nimmt eine entscheidende Rolle dieser Strukturen im Rahmen des Fortpflanzungsprozesses an. Dies betrifft nicht nur die Spermienmaturation, für die Vesikel aus dem Nebenhoden durch Transfer verschiedener Substanzen auf die Keimzellen essentiell sind (Gatti et al. 2004; Sullivan 2008). Die Vesikel haben auch einen großen Einfluss auf andere physiologische Vorgänge der Spermien. So

unterstützen sie die Aktivierung der Spermienmotilität (Stegmayr und Ronquist 1982a, 1982b, Arienti et al. 1999a), sie wirken auf Kapazitation und Akrosomreaktion (Bechoua et al. 2011; Pons-Rejraji et al. 2011; Palmerini et al. 2003) und schützen die Keimzellen außerdem durch ihre antioxidativen (Saez et al. 1998, 2000), antimikrobiellen (Carlsson et al. 2000a) und immunsuppressiven (Kelly et al. 1991; Skibinski et al. 1992) Eigenschaften vor Angriffen aus der Umgebung des männlichen sowie des weiblichen Genitaltrakts.

Die künstliche Besamung mittels Tiefgefriersperma in der Hundezucht erlangt seit dem ersten in der Literatur beschriebenen, erfolgreichen Einsatz (Seager 1969) eine immer größer werdende Bedeutung. Die Konzeptionsraten bei Besamung mit Tiefgefriersperma sind jedoch deutlich niedriger als bei einer Besamung mit frischem Rüdensperma (Linde-Forsberg und Forsberg 1993; Silva et al. 1996), weil die Spermien durch die Kryokonservierung geschädigt werden (Silva et al. 2009; Watson 2000; Burgess et al. 2001; Rota et al. 1999; Burgess et al. 2012), was in einer geringeren Fertilitätsrate resultiert. Die Vesikel aus dem Ejakulat sind enorm resistent gegen physikalische Umwelteinflüsse (Sullivan 2008; Ghaoui et al. 2004; Fabiani et al. 1994b). Da die vesikulären Strukturen aus dem Ejakulat bei anderen Spezies eine entscheidende Rolle im Rahmen der Fertilität spielen und die Spermien während des Fortpflanzungsvorganges maßgeblich unterstützen, stellt sich die Frage, ob individuelle Veränderungen der Qualität oder Quantität dieser seminalen Partikel im Ejakulat des Rüden einen Einfluss auf dessen Fertilitätsstatus haben. Die Vesikel könnten möglicherweise einen neuen, wichtigen Angriffspunkt für die Verbesserung der Besamungserfolge darstellen bzw. auch mit klinischer Infertilität in Zusammenhang stehen. Die Forschungsergebnisse von Aurich et al. (1996) an equinen Spermienproben legen die Vermutung eines positiven vesikulären Einflusses auf kryokonservierte Spermienzellen ebenfalls nahe. In dieser Studie wurden Hengste abhängig von der Einfriertauglichkeit ihres Ejakulats in zwei Gruppen eingeteilt (Gruppe 1: < 20% bzw. Gruppe 2: > 30% progressive Spermienmotilität nach Einfrieren und Auftauen der Spermaproben). Hengste mit Sperma schlechter Einfriertauglichkeit (Gruppe 1) zeigten dabei im Vergleich zur Kryokonservierung mit eigenem Seminalplasma eine höhere progressive Spermienmotilität, wenn vor dem Tiefgefriervorgang Seminalplasma von Probanden aus Gruppe 2 zugegeben wurde. Aufgrund dieser Überlegungen erschien eine nähere Erforschung der Situation des Rüden gewinnbringend.

Bis April 2012, dem Beginn dieser Arbeit, lag keine Veröffentlichung über vesikuläre Strukturen im caninen Ejakulat vor, sodass neben einer praxisorientierten Untersuchung der vesikulären Wirkung auf Tiefgefriersperma eine Erstbeschreibung in Form einer grundlegenden Erforschung der caninen Verhältnisse, der morphologischen Darstellung der Vesikel im Transelektronenmikroskop sowie einer Protein- und Lipidanalyse, sinnvoll erschien. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit publizierten Zelli et al. (2013) sowie Ronquist et al. (2013b) erste Daten zu den caninen Vesikeln, die sich mit der morphologischen Charakterisierung und Proteinzusammensetzung der Vesikel von gesunden Rüden befassten. Somit versteht sich diese Arbeit nun nicht mehr als Erstbeschreibung, aber dennoch als Ergänzung der bisherigen Erkenntnisse aus der Literatur.

5.2 Diskussion der Methodik

5.2.1 Diskussion der Probandenauswahl

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 35 Rüden abgesamt, die sich in zahlreichen Faktoren, wie beispielsweise Rassenzugehörigkeit, Alter oder bisheriger Zuchtnutzung, unterschieden. Einzige Auswahlkriterien waren die Geschlechtsreife (Alter > 1 Jahr) (Christiansen 1984) und die klinische Geschlechtsgesundheit der Rüden. Während Unterschiede in der Qualität der Spermaproben für die ultrastrukturelle und biochemische Untersuchung erwünscht waren, um vesikuläre Eigenschaften fertiler und infertiler Rüden ermitteln zu können, wurden für den Tiefgefriersversuch nur normosperme Rüden (progressive Motilität $\geq 75\%$; Pathomorphologie $\leq 20\%$) (Pesch et al. 2007) ausgewählt, um nach dem Auftauen eine möglichst gute Qualität zu gewährleisten. Generell wurden vorzugsweise Rüden mittelgroßer bis großer Rassen gewählt, weil das Ejakulatsvolumen und die Gesamtspermienzahl positiv mit dem Körpergewicht korrelieren (Günzel-Apel et al. 1994) und sie daher bei einmaliger Absamung mehr Probenmaterial lieferten als kleine Rassen (Goericke-Pesch et al. 2013). Dies war außerdem wichtig, weil der Ertrag der Vesikelmenge pro Ejakulat ohnehin gering war. Kleine Rassen wurden jedoch ebenfalls in die Studie einbezogen und aus diesem Grund zum Teil mehrfach abgesamt. Trotz des Risikos rasse- und altersabhängiger Einflüsse (Rijsselaere et al. 2012; Rijsselaere et al. 2007) erfolgte bewusst keine weitere Eingrenzung bei der Auswahl der Probanden, um durch die variable Rassen- und Altersstruktur das uneinheitliche Klientel des Praxisalltags abbilden zu können, bei

welchem die Versuchsergebnisse im Idealfall Anwendung finden sollten. Außerdem wurde auf diese Weise eine Unabhängigkeit der Proben gewährleistet.

Ein azoospermer Rüde (Nr. 35), der trotz lange (> 1 Jahr) zurückliegender Kastration eine erhaltene Libido zeigte, lieferte ebenfalls Genitalsekret, das auf Vesikelgehalt untersucht wurde. Da die Probenmenge jedoch sehr gering war, wurde sie lediglich zu einer licht-und transelektronenmikroskopischen Darstellung genutzt.

5.2.2 Methodik der Vesikelaufreinigung

Das Aufreinigungsprotokoll der caninen Vesikel wurde in Orientierung an den bisher in der Literatur beschriebenen Maßnahmen zur Vesikelisolierung aus dem Ejakulat erstellt. In Kapitel 2 findet sich ein Überblick über das generelle Vorgehen der vesikulären Aufreinigung und dessen Hintergründe. In der vorliegenden Arbeit wurden die vielfältigen Vorschläge aus der Literatur aufgegriffen und in Vorversuchen (siehe 3.4) für die Aufarbeitung der caninen Vesikel überprüft. Hauptkriterium für die Auswahl der einzelnen Bearbeitungsschritte war die Abwesenheit von Spermien und sonstigem zellulärem, vesikelfremden Material und damit die Reinheit der letztendlich erhaltenen Vesikelprobe. Wichtig war allerdings auch eine Optimierung des Vesikelertrages aus dem Ejakulat. Da mit steigender Umdrehungszahl der Zentrifugationen vor der ersten Ultrazentrifugation lichtmikroskopisch ein erhöhter Verlust von Vesikeln in das abgetrennte Spermienpellet zu beobachten war, wurde die Umdrehungszahl so weit als möglich minimiert. Eine ausreichende Geschwindigkeit zur Abtrennung der Spermien und zellulären Strukturen musste jedoch gewährleistet bleiben und war damit ein limitierender Faktor für die Reduktion der g-Zahl. Andere Methoden zur vesikulären Isolierung, wie Filtern bzw. Dichtegradientenzentrifugation mittels Silikatmedium, führten zu einer mangelhaften Trennung von Spermien und Vesikeln bzw. zu einer Verunreinigung der Vesikelprobe mit Silikatmaterial und kamen daher nicht in Frage. Das letztendliche Protokoll nutzte zur Abtrennung zellulären Materials im Vergleich zu den meisten anderen Protokollen aus genannten Gründen eine relativ niedrige, maximale g-Zahl vor der ersten Ultrazentrifugation. Zelli et al. (2013) und Ronquist et al. (2013), die ebenfalls mit Rüdensperma arbeiteten, zentrifugierten bei Umdrehungsgeschwindigkeiten von 5000 g bzw. 10000 g. Dies sichert eine hohe Reinheit der Probe, birgt jedoch auch die Gefahr einer verfälschten Analyse, weil hier mit hoher Wahrscheinlichkeit sehr große Vesikel vor der Analyse mit den Spermien verworfen werden. Dies kann sich nicht nur auf die Erhebung des

Vesikeldurchmessers, sondern auch auf Protein- und Lipidanalyse und weitere Funktionsanalysen auswirken, weil bislang unklar ist, ob Vesikel unterschiedlicher Zusammensetzung und Funktion existieren, die bei diesem Protokoll nicht in die Auswertung miteingehen würden. Umgekehrt kann man argumentieren, dass eine sehr niedrige Umdrehungszahl, wie sie in der vorliegenden Arbeit oder auch bei der Isolierung von Vesikeln aus der Nebenhodenflüssigkeit des Hamsters (Légaré et al. 1999) verwendet wurde, die Reinheit der Vesikelprobe gefährdet und dadurch bei Untersuchung der Proteine oder Lipide zu Kontaminationen führt. Dies ist durchaus ein berechtigter Einwand. Daher wurde die Reinheit der Probe im Rahmen der Vorversuche sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch nach Protokollende, d.h. nach Gelchromatographie und zweiter Ultrazentrifugation, überprüft. Während lichtmikroskopisch in mehreren Gesichtsfeldern abgesehen von den Vesikeln kein zelluläres Material detektierbar war, waren im Elektronenmikroskop vereinzelt 500–800 nm lange, 150 nm breite, längsovale, stark elektronendichte Strukturen zu erkennen, die von einer Doppelmembran umschlossen wurden, welche meist an einem Ende der Struktur unterbrochen war. Diese Strukturen sowie ihr Inhalt waren nicht eindeutig identifizierbar. Es ist möglich, dass es sich hierbei um präparationsbedingt aufgeplatzte Vesikel handelt. Genauso könnten aber vesikelfremde Strukturen spermiden Ursprungs vorliegen. Das Vorkommen dieser Gebilde war vergleichsweise selten und wurde damit als vernachlässigbar eingestuft.

Das mehrstufige Verfahren des Zentrifugationsprotokolls vor der ersten Ultrazentrifugation hat seinen Ursprung im experimentellen Vorgehen zur Etablierung des Protokolls (siehe 3.4). Eine einmalige Zentrifugation bei einer bestimmten Umdrehungszahl für eine bestimmte Zeitdauer würde dieses möglicherweise ersetzen können. Jedoch stellte sich genau das hier angewendete Verfahren im Rahmen der Vorversuche als eine zielführende Variante heraus und die hohe physikalische Resistenz der Vesikel machte eine weitere Vereinfachung nicht notwendig.

Zur Abtrennung der Vesikel von amorphen Anteilen des Seminalplasmas durch die Gelchromatographie wurden bisher meist Säulen mit Volumina von 40 bis etwa 85 ml verwendet (Fabiani et al. 1994b; Kelly et al. 1991; Arienti et al. 1999a; Palmerini et al. 2003; Renneberg et al. 1997; Zelli et al. 2013). In der hier beschriebenen Studie kamen kleinere Säulen (26,5 ml) zum Einsatz, da deren Auftrennungskapazität für die untersuchten kleinen Probenmengen ausreichend war (telefonische Rücksprache mit Experten der

Technikabteilung der Firma GE Healthcare und experimentelle Bestätigung anhand von aussagekräftigen Elutionsdiagrammen). Außerdem verkürzte die Reduktion des Säulenvolumens bzw. der Säulenlänge die Durchlaufzeit der Probe. Dies erhöhte zum einen die Praktikabilität des Protokolls, zum anderen wurde eine möglichst geringe Gesamtdauer der Vesikelaufreinigung angestrebt, um im Rahmen des Tiefgefrierversuches die Lagerzeiten der Spermien vor der Kryokonservierung, innerhalb welcher die Vesikel der jeweiligen Rüden nach Samengewinnung aufgereinigt werden mussten, möglichst gering zu halten.

Die Säulenkapazität hinsichtlich der maximalen Proteinmenge der pro Elution aufgegebenen Probe wurde in Vorversuchen ermittelt. Bei Mengen im Bereich von 800–1000 µg ergab sich eine schlechte Auftrennung der Probe, die im Elutionsdiagramm keine Unterscheidung von einzelnen Peaks mehr möglich machte. Unter 800 µg war eine deutliche Darstellung eines einzelnen Peaks (Vesikel) zu Beginn der Elution und mehreren, teilweise zusammenhängenden, nachfolgenden Peaks (amorpher Anteil des Seminalplasmas) im weiteren Elutionsverlauf zu beobachten, die eine klare Zuordnung der Fraktionen zuließen. Die Elutionsdiagramme gleichen denjenigen, die für andere Spezies in der Literatur beschrieben sind (Fabiani et al. 1994b; Stegmayr und Ronquist 1982a) und bestätigen damit die Möglichkeit des erfolgreichen Einsatzes einer Säule kleineren Volumens. Der Richtwert der maximalen Aufgabe von 30% des Säulenvolumens entstammt den Erfahrungen des Technik-Service der Firma GE Healthcare (telefonische Kommunikation). Die Flussrate, die hier von der Schwerkraft bestimmt wurde, lag in etwa bei 0,12 ml/min. Somit umfasste eine Fraktion etwa 0,36 ml, was im Vergleich zur Literatur (1-10 ml pro Fraktion) (Fabiani et al. 1994b; Renneberg et al. 1997; Kelly et al. 1991) sehr gering ist, jedoch eine hohe Genauigkeit des Elutionsdiagramms gewährleistete und somit an das geringere Säulenvolumen angepasst war. Der Abbruch der Elution nach 32 Fraktionen ergab sich experimentell, weil nach dieser Zeit alle relevanten Daten und Materialien gewonnen waren.

Falls die Vesikel nicht direkt weiter eingesetzt oder untersucht wurden, wurden sie bei -25 °C aufbewahrt. Dies sollte einer biochemischen Zersetzung von Lipid- und Proteinmolekülen vorbeugen. Für die Vesikel aus dem Ejakulat verschiedener Spezies ist eine hohe Resistenz gegen physikalische Einflüsse beschrieben, die sie beispielsweise Gefrierbehandlungen ohne strukturelle Schädigungen überstehen lassen (Sullivan 2008; Ronquist und Brody 1985; Ghaoui et al. 2004). Daher ist eine derartige Konservierung der Vesikel gängig und wurde

auch für Vesikel des Rüden (bis $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) angewendet (Zelli et al. 2013). Inwiefern neben der Struktur auch die vesikuläre Funktion erhalten bleibt, ist allerdings unklar.

5.2.3 Methodik der Spermagewinnung

Die Spermagewinnung fand nach gängiger und allgemein anerkannter Methode statt, die der Literatur zu entnehmen ist (Hoffmann 2003; Kutzler 2005; Freshman 2002; Blendinger 2007; Pesch et al. 2007; Kustritz et al. 2007). In Abweichung davon wurden die klinikseigenen Rüden (Nr. 1 und 2) aufgrund ihrer Erfahrung ohne Hündin erfolgreich abgesamt.

5.2.4 Methodik der spermatologischen Untersuchung

Alle gewonnenen Samenproben wurden direkt nach dem Absamvorgang unter Konstanterhaltung der Temperatur (37°C) aufbewahrt (Purswell et al. 1992; Freshman 2002; Iguer-Ouada und Verstegen 2001) und die Spermaparameter der Routineanalyse wurden erhoben. Dazu zählten die makroskopische und mikroskopische Beurteilung der einzelnen Fraktionen hinsichtlich Volumen, Konsistenz, Farbe, Geruch und Zusammensetzung, die subjektive lichtmikroskopische Beurteilung der Spermienmotilität und -dichte und die Auswertung des Lebend-Tot-Verhältnisses sowie der Pathomorphologie am Eosin-gefärbten Spermienausstrich (Hoffmann 2003; Freshman 2002; Martinez 2004; Johnston 1991). Das methodische Vorgehen orientierte sich hierbei an den Vorgaben aus der Literatur. Im Rahmen des Tiefgefrierversuches wurden die genannten Methoden durch die Beurteilung der Membranintegrität (HOS-Test) (Jeyendran et al. 1984; Kumi-Diaka 1993; Riesenbeck et al. 2001; Goericke-Pesch et al. 2013), der Kopfkappen bzw. des akrosomalen Status (Spermac®) (Goericke-Pesch et al. 2013) und durch die objektive computergestützte Spermienmotilitätsanalyse (CASA) ergänzt, um detailliertere Aussagen über die Veränderung der Spermieigenschaften in Anwesenheit der Vesikel treffen zu können. Die Pathomorphologie wurde dabei komplett am Spermac®-Ausstrich beurteilt, während der Eosin-Ausstrich nur der Ermittlung des Lebend-Tot-Verhältnisses diene.

Die Spermienmotilität steht in positiver Korrelation zur Membranintegrität (Rodriguez-Gil et al. 1994) und der normalen Spermienmorphologie (Ellington et al. 1993), sodass dieser Parameter bei geringem technischem Aufwand gleichzeitig wichtige Aussagen über die allgemeine Unversehrtheit des Spermiums liefert. Vor der Probenanalyse für die vorliegende

Arbeit erfolgte eine ausführliche Einarbeitung durch einen erfahrenen Untersucher und bei den meisten Probanden dessen Kontrollschätzung der Vorwärtsbeweglichkeit, um den subjektiven Einfluss auf die Analyseergebnisse (Yeung et al. 1997; Mortimer et al. 1986) möglichst gering zu halten.

Die Supravitalfärbung mittels des Farbstoffs Eosin hat sich aufgrund hoher Praktikabilität und Effizienz in der spermatologischen Routineuntersuchung etabliert (Riesenbeck et al. 2001; Hoffmann 2003) und wurde deshalb hier eingesetzt. Der Ausstrich wurde möglichst schnell im Anschluss an die Spermagewinnung angefertigt und stets wenige Minuten nach der Fertigstellung ausgewertet, sodass eine Auskristallisierung der Salze aus der Farbstofflösung (Martinez 2004) nicht auftrat.

Die Spermac®-Färbung ermöglicht im Gegensatz zur Eosin-Färbung eine detaillierte Darstellung der Kopfkappen und wurde für den Tiefgefrierversuch gewählt, weil bekannt ist, dass die vesikulären Strukturen im humanen Ejakulat die Akrosomreaktion beeinflussen (Palmerini et al. 2003; Bechoua et al. 2011; Pons-Rejraji et al. 2011) und bezüglich des Rüdenspermas dazu bisher keine Daten vorliegen.

Während die Eosin-Färbung nur eine physikalische Membranintaktheit voraussetzt, werden Zellen beim HOS-Test nur dann als membranintakt gewertet, wenn deren Membran darüber hinaus eine biochemische Funktionsfähigkeit besitzt (Jeyendran et al. 1992). Damit bietet dieser Test eine wertvolle Ergänzung zur Bewertung der Funktionalität der Spermienzellen und wurde deshalb hier zusätzlich eingesetzt.

5.2.4.1 Objektive Erfassung der Motilitätsparameter der Spermien mittels CASA

Die lichtmikroskopische Erfassung der progressiven Spermienmotilität ist subjektiv und kann abhängig vom Untersucher variieren (Yeung et al. 1997; Jequier und Ukombe 1983). Daher ist eine objektive, computer-gestützte Motilitätsanalyse eine sinnvolle Ergänzung zu den gängigen Methoden der spermatologischen Untersuchung. Denn es können nicht nur quantitative, sondern auch qualitative Eigenschaften erfasst werden, die das Bewegungsmuster der Spermien detailliert beschreiben (Iguer-Ouada und Versteegen 2001). Aus diesem Grund wurde im Rahmen des Tiefgefrierversuches die Computer-gestützte Motilitätsanalyse in Form des SpermVision®-Systems eingesetzt.

Die Einstellungen (siehe Anhang) und das Vorgehen orientierten sich dabei an den Vorgaben des Herstellers für die Spezies Hund und an Erkenntnissen aus der Literatur (Smith und England 2001; Rijsselaere et al. 2003; Schäfer-Somi und Aurich 2007; Iguer-Ouada und Versteegen 2001, Goericke–Pesch et al. 2012) und wurden für die Messungen aller Proben unverändert beibehalten, um eine Vergleichbarkeit zu erreichen. Auf eine Modifikation der Einstellungsparameter wurde generell verzichtet, da diese die Ergebnisse beeinflussen und allgemein eine Standardisierung angestrebt wird (Rijsselaere et al. 2003; Smith und England 2001; Dorado et al. 2011c).

Zur Erkennung der Spermienköpfe wurde eine Fläche von 20–60 μm^2 eingestellt. Diese Einstellung war entscheidend, damit das System bei der Messung zwischen Spermienzellen und anderen Zellen, Eigelbpartikeln des Verdünners oder Vesikeln unterscheiden konnte. Die Fläche eines physiologisch geformten, caninen Spermienkopfes beträgt etwa 20 μm^2 (Rijsselaere et al. 2004; Dahlbom et al. 1997) bis 35 μm^2 (Bartlett 1962) und liegt damit im Erkennungsbereich. Eine Studie von Martinez-Nunez et al. (2007) liefert geringfügig niedrigere Werte als die oben zitierten Studien, welche im Bereich von 14–16 μm^2 liegen. Von einer weiteren Erniedrigung der Flächengrenzen zur Spermienkopferkennung wurde auch jedoch abgesehen, um eine Verwechslung von Spermienköpfen und Vesikeln durch das System zu vermeiden. Trotzdem erkannte das System vereinzelt Nicht-Spermien-Material als Spermienzellen. Dies geschah jedoch so selten, dass es die Ergebnisse nicht maßgeblich beeinflusste.

5.2.5 Methodik der Elektronenmikroskopie

Das Protokoll zur Aufarbeitung der Vesikel für die Elektronenmikroskopie wurde, wie im Abschnitt 3.5 ausführlich beschrieben, experimentell entwickelt, wobei das Hauptkriterium eine optimale Beurteilbarkeit der vesikulären Ultrastruktur war. Das Vorgehen bei Einbettung und Bearbeitung der Proben orientierte sich an dem etablierten Protokoll des betreffenden Labors des Instituts für Veterinär-Anatomie, -Histologie und Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen und wurde nicht verändert.

Nachteile der transelektronenmikroskopischen Untersuchungsmethodik waren für die vorliegende Arbeit zum einen das geringe, analysierte Probenvolumen pro Aliquot, das die Gesamtprobe eventuell nicht repräsentativ abbildete, und die zweidimensionale Darstellung dreidimensionaler Strukturen. Da man aufgrund der geringen Probengröße nicht erfassen

konnte, an welcher Stelle bestimmte, abgebildete Strukturen geschnitten wurden, lag hier bei der Messung von größen- oder häufigkeitsbezogenen Parametern eine Unsicherheit, die möglicherweise zu einer Verfälschung der Ergebnisse geführt haben könnte. Dies ist bei der Interpretation auf jeden Fall zu berücksichtigen.

5.2.6 Methodik der Proteinanalyse

Zur Proteinanalyse wurden sowohl eine reine elektrophoretische Auftrennung mit nachfolgender Anfärbung der Proteinbanden (Coomassie- und Silber-Färbung) als auch eine MALDI-TOF-MS-Analyse durchgeführt. Die Darstellung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteinstruktur durch Anfärbung des Trägersgels hatte den Vorteil, dass ein erster Überblick über das Proteinspektrum erlangt wurde. Der Silberfärbung, die den Einsatz einer erheblich niedrigeren Proben- bzw. Proteinmenge erforderte, galt im Verlauf der Forschungsarbeit der Vorzug vor der anfänglich genutzten Coomassie-Färbung.

Die MALDI-TOF-MS-Proteinanalyse diente der genaueren Proteinidentifikation. Zur Untersuchung wurden sowohl prominente Banden als auch solche gewählt, die in deutlichem Unterschied zum Proteinspektrum der Spermien standen.

Für die MALDI-TOF-Analyse werden die Proteine vor der Durchführung mittels bestimmter Enzyme in Peptide gespalten. Die jeweils eingesetzten Enzyme spalten die Proteine an spezifischen Stellen, sodass jedes Protein ein eigenes Schnitt- und Peptidmuster erhält. Bei der Analyse ergeben sich daraus unterschiedliche Spektren, die mit anderen Spektren bereits bekannter Proteine aus Datenbanken nach einem bestimmten Algorithmus (hier mittels Mascot-Software; Perkins et al. 1999) abgeglichen werden (Domon und Aebersold 2006). Vor diesem Hintergrund ist es einleuchtend, dass die Proteinidentifikation durch eine geringe Probenmenge sowie Verunreinigungen oder mehrere Proteine innerhalb einer Probe erschwert wird. Dies könnte auch in der vorliegenden Arbeit ein Grund dafür sein, dass insgesamt trotz der zahlreichen Proben nur wenige Proteine eindeutig identifiziert werden konnten.

5.2.7 Methodik der Lipidanalyse

Die Lipidanalyse wurde hier unter Einsatz einer HPTLC mit nachfolgender Iodfärbung und Densitometrie durchgeführt. Das Prinzip der Dünnschichtchromatographie basiert auf dem

Vorhandensein von zwei unterschiedlichen Phasen, einer mobilen Phase und einer stationären Phase, und Substanzen, die aufgrund ihrer spezifischen Eigenschaften unterschiedliche Affinitäten zu beiden Phasen zeigen. Werden diese Substanzen durch die mobile Phase an der stationären Phase entlang transportiert, ergibt sich durch ein unterschiedliches Adhäsions- und Wanderverhalten eine Auftrennung der Probe. Eine (kostenintensivere) HPTLC hat im Vergleich zu einer TLC (Thin-layer chromatography) den Vorteil, dass auch die Detektion sehr geringer Probenmengen möglich ist. Dies war in der vorliegenden Arbeit aufgrund des geringen Probenertrags pro Rinde von großer Bedeutung, um Lipidgehalte der Einzelproben bestimmen zu können, ohne Proben unterschiedlicher Rinden poolen zu müssen. Deswegen wurden bei Vorversuchen zur Ermittlung der allgemeinen Laufbedingungen TLC-Platten verwendet, nach Etablierung des Protokolls zur Probenmessung jedoch HPTLC-Platten. Zur Identifikation der Probenlipide war außerdem das Mitführen von bekannten Standardlipidproben auf jeder Platte notwendig. Aus finanziellen Gründen wurde eine begrenzte Zahl von Standardlipiden (Cholesterol, Sphingomyelin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin) ausgesucht, die sich an der in der Literatur beschriebenen qualitativen und quantitativen Bedeutung der Lipide in den Vesikeln orientierte (Poulos und White 1973; Grizard et al. 2000; Arienti et al. 1999; Arienti et al. 1997c). Das Vorgehen bei der Ermittlung des genauen Protokolls für die HPTLC ist im Abschnitt 3.7 ausführlich dargestellt. Es konnten keine Bedingungen gefunden werden, die eine gleichzeitige, optimale Detektion von Sterolen und Sphingo-/Phospholipiden möglich machten, was in den stark unterschiedlichen chemischen Eigenschaften dieser beiden Lipidgruppen begründet liegt. Daher kam zur Cholesterolbestimmung zusätzlich ein kommerzielles Kit zum Einsatz.

Vor dem Hintergrund der individuell stark unterschiedlichen Werte war die Reproduzierbarkeit der Daten sehr wichtig. Der Vorversuch zur Verifizierung der Reproduzierbarkeit und zur entsprechenden Optimierung des Protokolls ist im Abschnitt 3.7 beschrieben. Obwohl eine 100%ige Reproduzierbarkeit der Werte nicht erreicht werden konnte, waren die letztendlichen Abweichungen zwischen Doppelansätzen sehr gering und wurden aus diesem Grund als vertretbar angesehen. Es konnte aus materialtechnischen Gründen nicht mit allen Proben der einzelnen Rinden gleichzeitig eine Phospholipid- und Cholesterolbestimmung durchgeführt werden, auch wenn dies natürlich wegen der höheren Aussagekraft angestrebt wurde.

Die Lipidextraktion erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Folch et al. (1957) und wurde leicht modifiziert (Vorgehen und Erläuterung siehe Abschnitt 3.7). Das nach der Folch-Extraktion zur Resuspension der Probe vor Probenauftrag auf die HPTLC-Platte eingesetzte Probenvolumen (50 µl) war relativ hoch. Dies wurde jedoch zugunsten der Reproduzierbarkeit der Daten in Kauf genommen und ist damit zu rechtfertigen.

Bei der Auswahl der Laufmittel für die Vorversuche wurde auf bereits erprobte Modelle aus der Literatur zurückgegriffen, die sich ebenfalls mit der Bestimmung von Lipiden befassten. Diese wurden für den Einsatz in dieser Arbeit entsprechend optimiert (siehe 3.7).

5.2.8 Methodik des Tiefgefrierversuches

5.2.8.1 Studiendesign und Zielsetzung

Teil 1 des Tiefgefrierversuches sollte den Einfluss der Vesikel aus dem Ejakulat auf die Spermien im Rahmen der Kryokonservierung untersuchen. Hierzu wurden 3 Gruppen gebildet. Gruppe 1 stellte hierbei die Kontrollgruppe dar. Sie enthielt ausschließlich Proben motiler Spermien, die während des gesamten Versuchs keinen Kontakt zu Vesikeln hatten. Gruppe 2 enthielt Spermienproben, denen Vesikeln in einer Konzentration von 0,04 mg Vesikelprotein/ml vor dem Einfriervorgang zugesetzt worden waren. Mit Hilfe dieser Gruppe sollte ein vesikulärer Effekt während des Kryokonservierungsprozesses untersucht werden. Verschiedene Forschergruppen beschäftigten sich bisher mit dem Zusatz von caninem Seminalplasma bzw. Prostataflüssigkeit zu caninen Spermienproben vor der Kryokonservierung (Strzezek und Fraser 2009; England und Allen 1992; Yamashiro 2009; Sirivaidyapong et al. 2001) und nach dem Auftauvorgang (Nöthling et al. 2005; Stănescu et al. 2012; Rota et al. 2007), woraus in der Literatur unterschiedliche, teilweise auch kontroverse Ergebnisse resultieren, die die Möglichkeit von unterschiedlichen Effekten abhängig vom Zugabezeitpunkt vermuten lassen. Da die Vesikel Teil des Seminalplasmas sind und sie vermutlich in den genannten Studien zumindest für einen Teil der Effekte verantwortlich waren, wurden in der dritten Gruppe die Proben zunächst ohne Vesikel eingefroren, aber direkt im Anschluss an den Auftauvorgang mit diesen in einer Konzentration von 0,04 mg Vesikelprotein/ml versetzt. Gleichzeitig konnte anhand dieser Gruppe eine Beeinträchtigung der Vesikelfunktion durch den Einfriervorgang, insbesondere durch die unklare Wirkung der Komponenten des Mediums der Dichtegradientenzentrifugation im Rahmen des Kryokonservierungsprozesses (siehe unten),

definitiv ausgeschlossen werden. Im Allgemeinen gelten Vesikel jedoch als sehr resistent gegen äußere Einflüsse. Weder Erhitzung der Proben auf 80°C noch Ultraschallbehandlung für 20 bzw. 30 Minuten mindern den Effekt der humanen Vesikel auf die Spermienmotilität (Fabiani et al. 1994b). Die Konzentration der zugesetzten Vesikel war im Vergleich zu Angaben aus der Literatur, wo eine Optimalkonzentration von 0,7-0,8 mg Vesikelprotein/ml und eine Konzentrationsabhängigkeit der Vesikelwirkung für die Spezies Mensch beschrieben werden (Fabiani et al. 1994b), relativ gering. Effekte der Vesikel auf die Spermienmotilität wurden in der betreffenden Studie jedoch auch schon im niedrigen Konzentrationsbereich (0,025-0,150 mg Vesikelprotein/ml) registriert. Die Reduktion der Konzentration im Vergleich zur Literatur erfolgte aufgrund des geringen Vesikelertrages pro Proband. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den unterschiedlichen Gruppen sowie den Proben der unterschiedlichen Rüden zu erreichen, war es wichtig, eine einheitliche Konzentration vor Versuchsbeginn festzulegen, die von jedem teilnehmenden Probanden sicher erreicht werden konnte. Diese lag bei 0,04 mg/ml. Zuvor angestrebte Überlegungen zur Erhöhung der Konzentration durch Verwendung von körperfremden Vesikeln (=Vesikeln anderer Rüden) oder von Vesikeln, die aus weiter zurückliegenden Absamungen des gleichen Rüden stammten, wurden aus verschiedenen Gründen und zu Gunsten einer Studierenerweiterung (Teil 2) verworfen. Darüber hinaus ist in der Literatur keine speziesübergreifende Gültigkeit der vesikulären Optimalkonzentration beschrieben. Die ermittelten Werte beziehen sich ausschließlich auf die Spezies Mensch und sind daher allenfalls als Orientierung für andere Spezies zu verstehen.

Um die Konzentrationsabhängigkeit der caninen Vesikelwirkung zu untersuchen, wurden in Teil 2 des Tiefgefrierversuchs wiederum drei Gruppen erstellt. Für alle Gruppen wurden die Spermien zunächst ohne Vesikel eingefroren. Nach dem Auftauen wurden sie mit unterschiedlichen Vesikelmengen versetzt, um eine aufsteigende Vesikelkonzentrationsreihe (0,05-0,1-0,2 mg Vesikelprotein/ml) zu erhalten. Dies war möglich, weil die Untersuchungsvorgänge auf die subjektive und objektive Erfassung der Motilitätsparameter reduziert wurden und daher eine geringere Probenmenge für die Ermittlung der Daten erforderlich war. Folglich musste auch weniger Vesikelmateriale eingesetzt werden, um höhere Konzentrationen in den Proben zu erreichen. Eine Konzentration nahe derjenigen in Versuchsteil 1 wurde als geringste Konzentrationsstufe gewählt. Die höchstmögliche,

praktikable Konzentration lag bei 0,2 mg Vesikelprotein/ml. Somit wurde 0,1 mg Vesikelprotein/ml als mittlere Konzentration festgelegt.

Das Probenmaterial für beide Versuchsteile wurde in einem Arbeitsgang gewonnen und bearbeitet, um gleiche Bedingungen zu gewährleisten und die Versuchsteile zueinander in Beziehung setzen zu können.

Als Untersuchungszeitpunkte wurden 0, 10 und 30 Minuten nach dem Auftauen gewählt. Ergebnisse aus dem Humanbereich zeigen, dass in diesem Zeitraum ein deutlicher Unterschied der Vesikelwirkung zwischen vesikelhaltigen und –freien Proben messbar ist (Fabiani et al. 1994b). Die erste Untersuchung zu Beginn des Versuchs lieferte einen Ausgangswert, um die nachfolgenden Veränderungen und eine eventuelle Zeitabhängigkeit der Vesikelwirkung beurteilen zu können. Die Messungen wurden zweimalig wiederholt, damit auch ein eventuell zeitlich verzögertes Einsetzen des vesikulären Effekts erfasst werden konnte. Die Messungen endeten 30 Minuten nach dem Auftauen, da nach dieser Zeit die Spermienmotilitätsreduktion unter in-vitro-Bedingungen so weit fortgeschritten war, dass eine Ausdehnung der Messdauer und eine weitere Beurteilung nicht sinnvoll erschienen.

Als Kriterium zur Bestimmung der Vesikelmenge wurde die Vesikelproteinmenge herangezogen. Eine Korrelation zwischen Vesikelzahl und Vesikelproteinmenge ist in der Literatur nicht belegt. Vor dem Hintergrund der morphologischen Heterogenität der Vesikelpopulation, die in dieser Arbeit beschrieben wird und die möglicherweise auch mit Unterschieden in der biochemischen Zusammensetzung assoziiert sein könnte, und im Hinblick auf die Tatsache, dass Proteine offenbar keine entscheidende Rolle im Rahmen der Vesikelwirkung auf die Spermienmotilität spielen (Fabiani et al. 1994b), ist der Einsatz dieser Größe als kritisch zu betrachten. Dennoch nutzen viele Autoren diese Messgröße zur Festlegung der eingesetzten Vesikelmenge (Fabiani et al. 1994b; Arienti et al. 1999a; Carlsson et al. 1997; Agrawal 1987). Die Proteinbestimmung (hier mittels BCA-Kit) hat den Vorteil, dass sie einfach, schnell und unter relativ geringem Probenaufwand durchführbar ist. Aus diesem Grund und zwecks Vergleichbarkeit mit der Literatur wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls auf die Methode der Proteinbestimmung zurückgegriffen.

Im Unterschied zur Aufreinigung der Vesikel für andere Versuche wurde die zweite Fraktion nicht zur Vesikelgewinnung herangezogen. Dies geschah im Hinblick auf die Umsetzbarkeit der Methodik in der Praxis, weil die spermienreiche Fraktion bei der Kryokonservierung von

Sperma für die künstliche Besamung zur Herstellung der Samen-Pailletten benötigt wird, so wie es auch unter Versuchsbedingungen der Fall war. Dahingegen steht die Prostataflüssigkeit (3. Fraktion) auch bei Konservierung des Spermas zur Verfügung. Die Tatsache, dass, wie in der vorliegenden Arbeit ermittelt, in der dritten Ejakulatsfraktion weniger Vesikel enthalten sind als in der zweiten Fraktion, konnte durch das hohe Volumen ausgeglichen werden.

5.2.8.2 Dichtegradientenzentrifugation

Für aussagekräftige Ergebnisse des Tiefgefriersversuches war die Gewinnung von vesikelfreien Spermienproben Voraussetzung, um die Vesikelkonzentration in den Proben im Anschluss manuell auf definierte Werte einstellen zu können. Zur Abtrennung von Spermien vom übrigen Seminalplasma gibt es verschiedene Methoden. Dazu gehören die Waschung von Spermien durch Verdünnung und anschließender Zentrifugation und Methoden, die auf Migration (z.B. Swim-Up-Verfahren) oder Filtration basieren sowie die Dichtegradienten- oder Single-Layer-Zentrifugation unter Verwendung von Kolloiden (Morrell und Rodriguez-Martinez 2009). Da die Methoden der Waschung und der Filtration keine reinen Spermienproben liefern, sondern durch geringe Reste des Seminalplasmas verunreinigt sein können (Henkel und Schill 2003), kamen diese Methoden für den Einsatz in der vorliegenden Arbeit nicht in Frage. Eine Vesikel-Spermien-Interaktion während der Inkubationszeit des Swim-Up-Verfahrens war nicht auszuschließen, weshalb auch diese Behandlungsweise nicht zum Einsatz kam und letztendlich die Methode der Dichtegradientenzentrifugation zur Auftrennung des Ejakulats gewählt wurde. Für die Dichtegradientenzentrifugation gibt es neben dem ursprünglich eingesetzten Percoll (Pertoft et al. 1978), das aus Polyvinylpyrrolidon-beschichteten Silikatpartikeln besteht, mittlerweile autoklavierbare Medien aus Silan-beschichteten Silikatpartikeln, darunter SpermFilter® (Gynemed GmbH & Co.KG, Lensahn, Deutschland), PureSperm® (Nidacon International AB, Göteborg, Schweden) und ISolate® (Irvine Scientific, Santa Ana, Kalifornien, USA) für die Humanmedizin sowie einige veterinärmedizinische Präparate, darunter z.B. BoviPure™, EquiPure™, PorciPure™ oder CapriPure™ (alle Nidacon International AB, Göteborg, Schweden). Die Dichtegradientenzentrifugation bietet bei einfacher Durchführung und geringem Zeitaufwand eine sichere Abtrennung hochmotiler Spermien von der restlichen

Ejakulatsflüssigkeit und immotilen Keimzellen (Morrell 2006; Morrell und Rodriguez-Martinez 2009). Das Funktionsprinzip basiert auf den unterschiedlichen Dichteigenschaften der Ejakulatskomponenten bzw. lebender und toter Samenzellen. Ein interspezifischer Einsatz des humanmedizinischen PureSperm®-Präparates für den Rüden ist mit Erfolg beschrieben (Dorado et al. 2011a; Dorado et al. 2011b; Prinosilova und Kopecka 2012; Phillips et al. 2012). Das in dieser Arbeit verwendete Medium SpermFilter® ist in seiner Wirkung mit PureSperm® vergleichbar (Laursen et al. 2003), sodass aufgrund der besseren Verfügbarkeit das Medium SpermFilter® für diese Arbeit ausgewählt wurde, obwohl ein Einsatz in der caninen Reproduktionstechnologie bisher nicht beschrieben ist.

Da die Verwendung von humanem Serumalbumin in Verbindung mit caninen Spermienzellen nach persönlicher Rücksprache mit erfahrenen Forschern als kritisch betrachtet wurde und eine schädigende Wirkung ausgeschlossen werden sollte, wurde zur Verdünnung des Gradientenmediums nicht das kommerziell erhältliche SpermWash® (Gynemed GmbH & Co.KG, Lensahn, Deutschland), sondern eine PBS-Lösung mit Zusatz von 6% BSA eingesetzt. Das Protokoll zur Durchführung der Dichtegradientenzentrifugation orientierte sich weitgehend an den Empfehlungen des Herstellers. Alle eingesetzten Lösungen wurden vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt, um den Spermien ein Milieu zu bieten, das den physiologischen Bedingungen möglichst nahe kam (Iguel-Ouada und Verstegen 2001) und temperaturinduzierte Schädigungen zu vermeiden. Wichtig bei der Zentrifugation des Gradienten war das Ausschalten der Bremsaktivität der Zentrifuge während des Laufes, um ruckartige Durchmischungen der Schichten des Gradienten am Ende des Zentrifugationsvorganges zu vermeiden. Hinsichtlich der Zentrifugationsdauer wurde das Protokoll leicht modifiziert, indem die Waschung nach Isolierung der motilen Spermien aus dem Gradienten von zwei (je 10 Minuten bei 300 g) auf vier Waschschrte (2 x 10 Minuten und 2 x 5 Minuten bei jeweils 300 g) erweitert wurde. Wie in Abschnitt 3.8 ausführlich beschrieben, zeigten die Spermien, die nur zweimalig (gemäß dem Protokoll des Herstellers für humane Proben) gewaschen worden waren, im Rahmen der Vorversuche nach dem Auftauen eine sehr niedrige Motilität. Die Erhöhung der Waschschrte verbesserte die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien nach dem Auftauvorgang maßgeblich, sodass eventuelle, negative Effekte auf die Spermien durch die insgesamt verlängerte Zentrifugationsdauer in Kauf genommen wurden (Lampiao et al. 2010). Pro Rüde wurden zwei Ansätze für die Kryokonservierung von Spermaproben in getrennten Tubes

aufgearbeitet, die je eine definierte Anzahl von Spermien (200 Millionen Spermien) enthielten, um die Kapazität des Gradienten nicht zu überschreiten. Die resultierenden Pellets wurden im Anschluss gepoolt, wobei die notwendige Menge zur Herstellung vesikelhaltiger Spermienpailletten davon abgetrennt wurde. Ein Nachteil des Silikatmediums bestand darin, dass das von den Spermien abgetrennte vesikelhaltige Seminalplasma nicht weiter verwendet werden konnte, weil das Medium bei der Ultrazentrifugation zur Vesikelgewinnung aus dem Seminalplasma einen geleeartigen, glasigen Zusatz im Vesikelpellet verursachte, der die nachfolgende Gelpermeationschromatographie störte.

Außerdem trat im Zusammenhang mit der Dichtegradientenzentrifugation die Problematik einer sehr niedrigen Spermienmotilität nach dem Auftauvorgang der Proben auf.

Es ist bekannt und durch viele Studien belegt (Dorado et al. 2013; Dorado et al. 2011b; Dorado et al. 2011a; Silva et al. 2002; Hermansson und Linde Forsberg 2006), dass der Anteil progressiv beweglicher Spermien nach Kryokonservierung im Vergleich zu Nativsperma aufgrund von Zellschäden unter anderem durch die Temperaturschwankungen und die damit verbundene Veränderung der osmotischen Verhältnisse (Silva et al. 2009; Watson 2000; Burgess et al. 2001; Rota et al. 1999; Burgess et al. 2012) sinkt. Die Reduktion der Vorwärtsbeweglichkeit sollte jedoch maximal etwa 20% betragen (Pesch et al. 2007). Niedrigere Motilitäten könnten zum einen bei normospermen Rüden eine Folge fehlerhaft zusammengesetzter Verdünner oder falscher Methodik sein. Zum anderen können auch individuelle Unterschiede zwischen den Rüden eine Rolle spielen (England 1993; Yu et al. 2002). Im Fall der vorliegenden Arbeit schlossen erwartungsgemäße Motilitätsergebnisse von Spermien nach Kryokonservierung ohne Dichtegradientenzentrifugation die Möglichkeit eines fehlerhaft durchgeführten Protokolls oder fehlerhafter Medien aus. Die Tatsache, dass der motilitätsreduzierende Effekt bei mehreren, verschiedenen Probanden auftrat, die zum Teil auch schon vorher unabhängig von dieser Studie kryokonserviertes Sperma guter Qualität geliefert hatten, schloss individuelle Einflüsse zwar nicht aus, machte sie aber als Hauptursache unwahrscheinlich, sodass dieser Effekt sicherlich nur eine untergeordnete Rolle spielt. Der Hauptgrund für die extreme Motilitätsreduktion nach dem Auftauen der Spermienproben lag somit vermutlich im Vorgang der Dichtegradientenzentrifugation, die den einzigen Unterschied zur in der Klinik durchgeführten, routinemäßigen Kryokonservierung darstellte.

Das Medium SpermFilter® ist laut Hersteller aus Silan-beschichteten Silikatpartikeln, isotonischer Phosphatpufferlösung sowie HEPES-Pufferlösung zusammengesetzt. Detaillierte Angaben liegen nicht vor. Schäfer-Somi et al. (2007) berichteten über einen geringgradig negativen Einfluss von PBS auf die Spermienmotilität im Vergleich zu anderen Verdünnern. Weiterhin bleibt die Wirkung der Silan-beschichteten Silikatpartikel auf die Spermien unklar und es wird eine motilitätsdepressive Interaktion mit den Samenzellen vermutet, da der negative Einfluss vor allem nach dem Auftauen deutlich wurde und durch den Einsatz von BSA und mehrfache Waschungen teilweise verhindert werden konnte. Das Problem der niedrigen Motilität konnte in Vorversuchen nicht vollständig gelöst werden. Letztendlich wurde eine geringe Motilität akzeptiert, da es zunächst einmal nur um die Erfassung von Unterschieden zwischen den verschiedenen Ansätzen ging und bei einer Spannweite der Werte von etwa 0-60% (Extremwerte des Anteils progressiver Beweglichkeit) bzw. 0-30% (mittlere Werte des Anteils progressiver Beweglichkeit) die Möglichkeit zur Beurteilung und zum Vergleich der Gruppen untereinander gegeben war.

5.2.8.3 Kryokonservierung der Spermien

Abweichend vom etablierten Kryokonservierungsprotokoll nach Linde-Forsberg (2001), wurden die Spermaproben vor der Zugabe des zweiten Verdünners 24 h bei 4 °C gelagert. Die lange Zwischenlagerungszeit wurde aus praktischen Gründen eingefügt, weil in dieser Zeit die Vesikel des jeweiligen Rüden aufgereinigt werden mussten. Es ist jedoch erwiesen, dass sich eine gekühlte Lagerung über 24 h vor dem Einfriervorgang nicht negativ auf die Spermienmotilität und –membranintegrität nach dem Auftauvorgang auswirkt (Hermansson und Linde Forsberg 2006).

Der Einfrier- sowie der Auftauvorgang bestimmen den Anteil überlebender Spermienzellen maßgeblich (Gao et al. 1993; Holt und North 1994). Der im eingesetzten Protokoll stattfindende Temperaturübergang von Raumtemperatur auf etwa 4 °C während der Lagerung der verdünnten Spermaproben im Kühlschrank entspricht einer geschätzten, mittleren Kühlungsrate von 0,15–0,30 °C/Minute (Rodenas et al. 2014), die für canine Samenzellen als gut verträglich gilt, wobei nach neuesten Erkenntnissen sogar höhere Kühlungsraten von 2,25 °C/Minute zu akzeptablen Ergebnissen führen (Rodenas et al. 2014). Die weitere Abkühlung erfolgte in einer Styroporbox im Stickstoffdampf, was ein allgemein anerkanntes Verfahren vor dem Einbringen in den flüssigen Stickstoff (-196 °C) darstellt

(Schäfer-Somi et al. 2006; Pena et al. 2003; Rodenas et al. 2014). Der Auftauvorgang erfolgte bei 37°C für 1 Minute. Dies war der mittleren Kühlungsrate des Protokolls angepasst und stimmt ebenfalls mit gängigen Protokollen überein (Linde-Forsberg 2001).

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Elektronenmikroskopie

Im Gegensatz zu anfänglichen Vermutungen enthielten alle 35 untersuchten, caninen Ejakulatsproben Vesikel unabhängig von Rasse, Alter oder Fertilität. Diese waren, wie bei anderen Spezies auch (Ghaoui et al. 2004), vornehmlich in der spermienreichen Fraktion zu finden. Die vesikuläre Identifikation war sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch durchführbar, weil andere membranumschlossene Strukturen, wie Erythrozyten (7 µm) (Liebich 2004) oder Leukozyten (>9 µm) (Liebich 2004) sowie weiteres zelluläres Material, sich in Größe und Morphologie von den Vesikeln unterschieden. Die Länge des caninen Spermienkopfes (etwa 7 µm) (Rijsselaere et al. 2004) diente hierbei zur Orientierung.

Der mittlere Vesikeldurchmesser bei Normospermie betrug nach Analyse der Ultrastruktur von circa 4500 Vesikeln im Transelektronenmikroskop etwa 195 nm. Im Unterschied zu den gemessenen Werten aus der elektronenmikroskopischen Darstellung lag der maximale Vesikeldurchmesser bei lichtmikroskopischer Betrachtung einzelner Vesikel aus dem unbehandelten Ejakulat höher (etwa 3,3 µm (TEM) versus 3,8 µm (LM)). Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass bei Isolierung der vesikulären Strukturen aus dem Ejakulat ein Verlust von großen Vesikeln in das Spermienpellet eintrat. Daher ist davon auszugehen, dass der mittlere Vesikeldurchmesser tatsächlich geringfügig höher liegt als derjenige, der anhand der transelektronenmikroskopischen Darstellung ermittelt wurde. Mittlere Vesikeldurchmesser aus der Literatur von Mensch (150 nm ± 110 nm, Spannweite von 40–493 nm) (Brody et al. 1983), Eber (130,9 ± 3,22 nm, Spannweite 18–577 nm) (Ghaoui et al. 2004), Hengst (164.1 ± 4.42 nm, Spannweite 15–671 nm bzw. mittlerer Durchmesser 100 nm, Spannweite 75–175 nm) (Ghaoui et al. 2004; Minelli et al. 1998), Schafbock (159,7 nm ± 2,92, Spannweite 22–986 nm) (Ghaoui et al. 2004) und Kaninchen (70 nm) (Minelli et al. 2003) liegen niedriger als die caninen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Die Untersuchung caniner Vesikel durch die Forschergruppe um Zelli (2013) ergab ebenfalls niedrigere Mittelwerte (117,6 ± 86,9 nm, Spannweite 24,4 bis 716,6 nm). Mit Ausnahme der Studie von Brody et al. (1983), die Untersuchungen an Prostatagewebeschnitten durchführten, wurde

die Isolierung der Vesikel aus dem Ejakulat für die ultrastrukturelle Darstellung in den genannten Studien mit Hilfe von Zentrifugationen bei Umdrehungszahlen von 800 g bis 10000 g durchgeführt. Da in der vorliegenden Arbeit schon bei einer Umdrehungszahl von 500 g ein deutlicher Vesikelverlust in das zu verwerfende Spermienpellet eintrat, der bei lichtmikroskopischer Kontrolle vor allem große Vesikel betraf, ist es möglich, dass der tatsächliche mittlere Vesikeldurchmesser sowie die maximalen Extremwerte auch bei anderen Spezies höher liegen als bisher in der Literatur beschrieben. Außerdem ist damit auch der Unterschied zu den Ergebnissen von Zelli et al. (2013) einleuchtend, die die Ejakulatsproben vor ultrastruktureller Betrachtung einer Zentrifugation bei 5000 g (30 Minuten) unterzogen, um Zelldetritus und Spermien abzutrennen. Ein Hinweis darauf, dass die vorliegenden Ergebnisse keine speziesspezifische Ausnahme bilden, liefert die Studie von Castellini et al. (2012). Hier betrug die maximale Umdrehungszahl bei der Vesikelaufarbeitung von Kaninchen ebenfalls 500 g und lieferte Vesikeldurchmesser einer Größe bis 4 μm .

Auffällig war die Reduktion der Vesikelgröße (max. Vesikeldurchmesser 1314 nm (Azoospermie) bzw. 2096 nm (Hypokinozoospermie) vs. 3289 nm (Normospermie)) und des Anteils großer Vesikel bei den infertilen Probanden im Vergleich zur Situation bei Normospermie. Hinweise auf vesikuläre Veränderungen bei Infertilität, wie Reduktion der Vesikelquantität (Brody et al. 1981) oder der Vesikelgröße (Aalberts et al. 2012), finden sich auch beim Menschen. Es ist jedoch zu bedenken, dass im vorliegenden Fall (n=3) ebenfalls die Möglichkeit einer individuellen Veränderung besteht.

Die morphologische Struktur der caninen Vesikel, die sich als bi- bis multilamellär membranumschlossene rundlich-ovale Gebilde darstellten, stimmt mit dem vesikulären Aufbau bei anderen Spezies (Brody et al. 1983; Ghaoui et al. 2004; Piehl et al. 2006; Arienti et al. 1998; Minelli et al. 1998; Agrawal 1987; Metz et al. 1968; Rejraji et al. 2006; Griffiths et al. 2008) sowie den Ergebnissen für den Rüden von Zelli et al. (2013) überein. Auch sind in der Literatur sowohl singuläre Vesikel als auch das Vorkommen multivesikulärer Strukturen (Speichervesikel) beschrieben (Brody et al. 1983; Agrawal 1987). Eine derart umfassende Klassifizierung der Vesikel nach rein morphologischen Kriterien wie in der vorliegenden Forschungsarbeit findet sich in der Literatur jedoch nicht. Poliakov et al. (2009) unterscheiden beim Menschen 3 Vesikeltypen nach der Zahl der ineinanderliegenden Vesikel („Multiplizität der Vesikel“), der Vesikelform, der Elektronendichte der Vesikelstruktur und

deren Oberflächenstruktur. Daneben sind zahlreiche Ansätze zur Definition bzw. Abgrenzung von vesikulären Subpopulationen beschrieben, die sich zum Teil auf morphologische Kriterien und zum Teil auf das Vorhandensein von bestimmten biochemischen Vesikelkomponenten stützen (Aalberts et al. 2012; Zelli et al. 2013; Metz et al. 1968; Davis 1973; Fornes et al. 1995). Ob die unterschiedliche Morphologie im Transelektronenmikroskop, wie sie in der vorliegenden Arbeit dargestellt ist, gleichzeitig funktionell unterschiedliche Vesikeltypen abbildet, ist unklar. Da jedoch auch andere Autoren die Möglichkeit unterschiedlicher Vesikelpopulationen mit jeweils spezifischer Funktionalität in Betracht ziehen (Poliakov et al. 2009), erschien es sinnvoll die morphologische Heterogenität der vesikulären Partikel durch die Einteilung in 11 Typen herauszustellen. Darüber hinaus konnten auf diese Weise besonders häufige bzw. seltene Vesikelvarianten deutlich hervorgehoben werden.

Es ist nicht klar, ob Vesikeltyp L, die einzigen länglich geformten Vesikel, in vivo in dieser Art existiert oder ob die längliche Gestalt ein Artefakt aus der Aufarbeitung ist. Beim Menschen ist ein solcher Typ ebenfalls beschrieben (Poliakov et al. 2009). Zusammen mit der Beobachtung, dass vereinzelte Vesikel nasenartige Ausziehungen zeigen, könnte man spekulieren, dass sowohl die letztgenannten als auch die länglichen Vesikel Stadien eines Prozesses sind, bei dem Vesikel miteinander interagieren und zu größeren Vesikeln fusionieren. Diese Art der vesikulären Fusion ist für humane Vesikel belegt (Bordi et al. 2001). Direkte Hinweise fanden sich in der Auswertung der im Rahmen der Studie erstellten elektronenmikroskopischen Bilder aber nicht. Dies kann allerdings im methodischen Vorgehen begründet liegen. Als Grundlage für eine vesikuläre Interaktion mit den Spermien werden beim Menschen hydrophobe Wechselwirkungen vermutet, für deren Darstellung der Einsatz eines hydrophoben Einbettungsmediums keine geeigneten Bedingungen bietet (Ronquist et al. 1990). Falls auch der intervesikuläre Kontakt beim Rüden auf hydrophober Basis abläuft, wäre eine eventuell in vivo vorhandene, hier aber nicht detektierbare vesikuläre Interaktion durch die Verwendung von dem hydrophoben Epoxidharz Epon erklärbar.

Die Vesikelzusammensetzung des azoospermen Rüden legt nahe, dass sich die Vesikelpopulation auch abhängig vom hormonellen Einfluss verändert. Im Vergleich zur Normospermie sind hier Vesikel des Typs C1 deutlich häufiger und multivesikuläre Strukturen liegen zumeist in kleiner Form (Vesikeltypen H, K1, i) vor. Eventuell ist dies auf

eine mit der Kastration einhergehende reduzierte Drüsenaktivität zurückzuführen. Die Bedeutung der Erhöhung des Anteils des Vesikeltyps L bleibt allerdings unklar. Gleichzeitig muss ein teilweiser testikulärer und/oder epididymaler Ursprung der Vesikel diskutiert werden.

Aufgrund der schlechten Verfügbarkeit aussagekräftiger, gewebe- und vor allem prostataspezifischer, caniner Antikörper war es nicht möglich einen direkten Nachweis des vesikulären Ursprungs beim Rüden über immunochemische bzw. immunohistochemische Verfahren zu erbringen. Jedoch deutet die Existenz von vesikulären Strukturen im Ejakulat des azoospermen Kastraten (Rüde 35) darauf hin, dass die Vesikel zumindest teilweise der Prostata entstammen, wie es auch beim Menschen der Fall ist (Brody et al. 1983; Renneberg et al. 1997). Ob die Vesikelpopulation insgesamt ein Mischprodukt verschiedener Geschlechtsdrüsen ist, bleibt offen. Neben Prostata und Nebenhodenepithel kommen auch die Spermien als Vesikelquelle in Frage, die regelmäßig membranumschlossene Abschnürungen in Form von Zytoplasmaresten in ihre Umgebung absondern (Cooper 2011). Zwar scheint die Beobachtung, dass Rüde 33, der eine erhöhte Anzahl an Spermien mit nicht abgesonderten Zytoplasmotropfen aufwies und lichtmikroskopisch auffällig wenige, freie vesikuläre Strukturen erkennen ließ, für einen solchen Ursprung zu sprechen, jedoch waren alle ultrastrukturell dargestellten Vesikel frei von Organellen, was diese Hypothese unwahrscheinlich macht (Bloom und Nicander 1961). Außerdem zeigte die Proteinanalyse von Spermien und Vesikeln im Vergleich ein stark unterschiedliches Proteinspektrum. Dies schließt einen vesikulären Ursprung aus den Samenzellen nicht aus, spricht aber eher dagegen.

Die reduzierte Vesikelmenge nach mehrfacher Absamung bei den Rüden 1 und 2 spricht dafür, dass es sich bei der Vesikelbildung um einen Prozess handelt, der zwischen den Vesikelabgaben eine Regenerationszeit erfordert.

5.3.2 Proteinanalyse

Die elektrophoretische Auftrennung des Vesikelproteoms ergab Proteinbanden sowohl im nieder- als auch im mittleren und hochmolekularen Bereich (10-170 kDa). Dies stimmt mit den Resultaten anderer Spezies (Siciliano et al. 2008; Ronquist et al. 2013b; Gatti et al. 2005; Ecroyd et al. 2004) überein und bestätigt auch beim Rüden eine komplexe Proteinstruktur der Vesikel. Während das Coomassie-gefärbte Proteingel die quantitative Dominanz von

Proteinen im Bereich von 17, 40, 60 und 65 kDa belegte, ließ sich durch die sensitivere Silberfärbung die Komplexität des vesikulären Proteinmusters darstellen. Beim Vergleich mit dem Proteinmuster der Spermien zeigten sich deutliche Unterschiede, sodass es durchaus denkbar wäre, dass canine Vesikel bestimmte Proteine auf die Spermien transferrieren und deren Proteinspektrum auf diese Weise ergänzen, wie es für andere Spezies in der Literatur (siehe Kapitel 2) beschrieben ist.

Die MALDI-TOF-MS-Analyse ergab die Identifikation von verschiedenen Formen des Strukturproteins Aktin und die Identifikation des Proteins S100A9.

Aktin ist ein hoch konserviertes Protein (Molekulargewicht etwa 42 kDa) und Bestandteil des Zytoskeletts (Liebich 2004). Aufgrund des fast ubiquitären Vorkommens im Säugerorganismus war ein Nachweis von Aktin in Vesikeln, die vermutlich von Drüsenzellen sezerniert werden, zu erwarten. Auch in vesikulären Strukturen von Eber (Piehl et al. 2013), Mensch (Utlej et al. 2003 Jul 1), Bulle, Hengst (Ronquist et al. 2013b) und Schafbock (Gatti et al. 2005) sind in der Literatur bereits Formen des Aktins nachgewiesen.

Aktin existiert in verschiedenen, sehr ähnlich aufgebauten Isoformen, die einer Genfamilie entstammen (Perrin und Ervasti 2010). Die Identifikation verschiedener Varianten durch den Mascot-Algorithmus in der vorliegenden Arbeit ist höchstwahrscheinlich auf die hohe Ähnlichkeit zwischen den Strukturen zurückzuführen und die signifikanten Ergebnisse sind deshalb kritisch zu hinterfragen. Während Isoformen, wie α_{skeletal} -Aktin und α_{cardiac} -Aktin, die normalerweise in der quergestreiften bzw. der Herzmuskulatur vorkommen, als Vesikelkomponenten unwahrscheinlich erscheinen, sind die zytoplasmatischen Aktinvarianten (β_{cyto} -Aktin and γ_{cyto} -Aktin) als vesikuläre Bestandteile vorstellbar, zumal β_{cyto} -Aktin als vesikulärer Bestandteil beim Rüden beschrieben ist (Ronquist et al. 2013b).

Aktin spielt zusammen mit anderen Proteinen unter anderem bei der Erhaltung der Zellstabilität, der Verankerung von Transmembranproteinen und der Membranfusion eine Rolle (Liebich 2004; Eitzen 2003). Es ist bekannt, dass auch andere Membranfusionsrelevante Proteine, wie z.B. Annexine, Tetraspanin CD9, Syntaxine oder Rab/Ras-Proteine (Ronquist et al. 2013b), in caninen Vesikeln vorzufinden sind. Vor diesem Hintergrund ist es nicht unwahrscheinlich, dass auch die Vesikel des Rüden dazu befähigt sind, mit anderen Strukturen, beispielsweise Vesikeln oder Spermien, zu fusionieren, auch wenn eine wissenschaftliche Bestätigung bislang aussteht.

Das Protein S100A9 ist ein Calcium-bindendes Protein, das zur Familie der Calcium-bindenden S100 -Proteine gehört (Marenholz et al. 2006). Das Protein tritt bei Mensch und Hund als Homodimer, am häufigsten jedoch als Heterodimer im Komplex mit S100A8 auf (Itou et al. 2002; Korndörfer et al. 2007) (Heilmann et al. 2008).

S100A9 bzw. S100A9/A8 wird in myeloiden Zellen und Tumorzellen (Imaoka et al. 2008; Kurata et al. 2005; Striz und Trebichavsky 2004), in gastrointestinalen Zellen (Fanjul et al. 1995; Wang et al. 2004) und humanen Vesikel aus dem Ejakulat (Poliakov et al. 2009) exprimiert. Darüber hinaus wurde auch in Vesikeln aus Prostatatumormetastasen eine Expression von S100A9 beobachtet (Ronquist 2009). Das Protein ist als Bestandteil des humanen Spermienproteoms (Martinez-Heredia et al. 2008) beschrieben, jedoch geht aus dem Studiendesign von Martinez–Heredia et al. (2008) nicht eindeutig hervor, welche Zeitspanne zwischen der Ejakulation und der Abtrennung des Seminalplasmas lag, sodass ein Transfer von vesikulärem S100A9 auf die Spermien nicht auszuschließen ist und es unklar bleibt, ob Spermien dieses Protein auch ohne vorherigen Vesikelkontakt tragen.

Die erhöhte Expression bei entzündlichen Prozessen (Striz und Trebichavsky 2004) sowie bei tumorösen Veränderungen, wie z.B. bei gastrointestinalen Tumoren (El-Rifai et al. 2002) und Prostatatumoren (Heilmann et al. 2014; Hermani et al. 2005), macht den Einsatz des Proteins bzw. des Proteinkomplexes S100A9 bzw. S100A9/A8 als Marker für Entzündungsgeschehen bei Mensch (Foell et al. 2004) und Hund (Grellet et al. 2013) (Heilmann et al. 2012) sowie als Screeningparameter bei humanen und caninen Prostatatumoren (Heilmann et al. 2014; Hermani et al. 2005) interessant. Im Falle eines Patienten mit Asthenozoospermie war außerdem im Vergleich zu normospermen Probanden eine geringere S100A9 –Expression festzustellen (Martinez-Heredia et al. 2008).

Im Komplex mit dem Protein S100A8 werden S100A9 zahlreiche Funktionen im Bereich der Interaktion mit Immunzellen zugeschrieben, darunter der proinflammatorische Einfluss auf vaskuläre Entzündungsprozesse sowie auf die Aktivität von myeloiden Zellen (Croce et al. 2009; Vogl et al. 2007; Vogl et al. 2004; Ryckman et al. 2003). Weiterhin fördert der Komplex S100A9/A8 als proangiogenetischer Faktor die Neovaskularisation (Li et al. 2012a) und die Tumorigenese sowie das Tumorwachstum (Ichikawa et al. 2011). Analysen der Zusammensetzung der Corpora amylacea, Konkrementen aus dem prostatistischen Gewebe, ergaben S100A8/A9 als wichtige Komponenten, weshalb ein Zusammenhang mit der Entwicklung von Neoplasien vermutet wurde (Yanamandra et al. 2009).

Welche Funktionen dem Protein S100A9 jedoch in den Spermien bzw. in den Vesikeln zukommen, ist unklar. Bei humanen Vesikeln aus Prostatatumormetastasen wird aufgrund der bekannten Eigenschaften eine proangiogenetische und damit tumorfördernde Eigenschaft vermutet (Ronquist 2009).

Im Hinblick auf weitere mögliche Funktionen unter physiologischen Bedingungen, bleibt es offen, ob das Protein S100A9 seine Wirkung in den Vesikeln entfaltet, ob es von diesen in den Extrazellularraum freigesetzt wird, wie es bei Neutrophilen Granulozyten und Monozyten beschrieben ist (Boussac und Garin 2000; Rammes et al. 1997), oder ob vesikulären Strukturen nur als Vehikel dienen und das Protein auf Spermien übertragen, es also erst dort intrazellulär funktionell aktiv ist.

Aufgrund mangelnder Erkenntnisse in der caninen Forschung müssen für die folgenden Überlegungen zum Teil speziesfremde Studienresultate als Diskussionsgrundlage herangezogen werden. Des Weiteren wird die Möglichkeit des S100A9-Proteintransfers von Vesikeln auf Spermien als Voraussetzung angenommen, auch wenn sie beim Rüden bisher in der Literatur nicht beschrieben ist. Da ein Proteintransfer bzw. eine Vesikel-Spermienfusion für viele andere Spezies belegt ist (siehe Kapitel 2), erscheint diese Annahme jedoch vertretbar.

Zunächst soll die Möglichkeit einer intrazellulären Wirkung des Proteins S100A9 bzw. S100A9/A8 betrachtet werden.

In humanen Neutrophilen Granulozyten wirkt S100A9 über eine Interaktion mit Untereinheiten des NADPH-Oxidase-Komplexes und über eine Bindung bzw. einen Transfer von Arachidonsäure aktivierend auf die NADPH-Oxidase (Isoform Nox 2) und führt hier zur Produktion von ROS (reactive oxygen species) und zum „oxidative burst“ der Immunzellen (Kerkhoff et al. 2005). Auch humane Spermien besitzen eine Isoform der NADPH-Oxidase (Nox 5), deren ROS-Produktion allerdings um einiges niedriger liegt als diejenige der Granulozyten (Armstrong et al. 2002). Ob in Samenzellen und/oder Vesikeln eine Aktivierung der Nox 5 durch das Protein S100A9 stattfinden kann, ist in der Literatur nicht beschrieben. Dies ist jedoch nicht auszuschließen. Somit wäre eine Beeinflussung der Spermienfunktion, genauer der Kapazitation und der Spermienmotilität, mittels ROS durch S100A9 denkbar (Ford, W C L 2004; Aitken 2000; O'Flaherty et al. 2006).

Das intrazelluläre Vorkommen des Komplexes S100A9/A8 erschwert überdies die Bindung und Invasion von Mikroorganismen an Wirtszellen (Nisapakultorn et al. 2001a, 2001b), was

eine protektive Vesikelfunktion nahelegt, sofern sie das Protein auf Samenzellen übertragen. Unter der Annahme einer Freisetzung des caninen Proteins S100A9 bzw. des Proteinkomplexes S100A9/A8 durch die Vesikel in den Extrazellularraum ist außerdem eine ähnliche antimikrobielle Funktion denkbar, wie sie bei Einsatz dieses Komplexes in vitro beim Hund gegen *E. Coli* BL21 beschrieben ist (Heilmann et al. 2008).

Weitere mögliche Wirkungen von sezerniertem S100A9 bzw. S100A9/A8 könnten ferner über die Interaktion mit verschiedenen Rezeptoren, wie beispielsweise dem RAGE-Rezeptor (Receptor for advanced glycation end-products) oder dem TLR 4 (Toll-like-Rezeptor 4), auf der Spermienoberfläche vermittelt werden. Während die Aktivierung des RAGE-Rezeptors über eine ROS-Produktion (Wautier et al. 2001) die Spermienfunktion beeinflussen könnte, ist es möglich, dass die Aktivierung des TLR 4-Rezeptors zu einer NO-Produktion führt (Pouliot et al. 2008; Vogl et al. 2007), die sich in geringer Konzentration positiv auf die Spermienphysiologie auswirkt (Herrero et al. 2003; O'Flaherty et al. 2006; Lamirande et al. 2009; Roessner et al. 2010).

Calciumionen spielen in der Physiologie der Spermien eine große Rolle. Hohe intrazelluläre Calciumionenkonzentrationen sind im Verlauf der Prozesse der Spermienmotilität, der Hyperaktivierung, der Kapazitation und der Akrosomreaktion (Ho und Suarez 2001; Suarez et al. 1993; Evans und Florman 2002; Darszon et al. 2006) essentiell für einen physiologischen Ablauf. Somit könnte S100A9 durch seine Calciumionen-bindende Eigenschaft auch eine regulatorische Funktion auf die extra- oder intrazelluläre Calciumionenkonzentration der Spermien und damit auf die Prozesse der Spermienphysiologie ausüben. Analoge Überlegungen bezüglich einer Calciumionen-regulierenden Funktion finden sich in der Literatur bei myeloiden Zellen, die das Protein in großer Menge enthalten (Nacken et al. 2003). Ob in Vesikeln bzw. Spermien eine ausreichende Proteinquantität für einen relevanten Einfluss auf den Calciumionenhaushalt vorhanden ist, ist fraglich und bedarf weiterer Erforschung.

5.3.3 Lipidanalyse

Alle vier untersuchten Lipidsubstanzen konnten in den Vesikeln nachgewiesen werden. Weitere in der HPTLC nachgewiesene Lipidbanden, die aufgrund fehlender Standards nicht näher identifiziert werden konnten, lassen auf ein komplexes Lipidmuster der Vesikel schließen. Dies entspricht den Resultaten anderer Spezies, wie Mensch, Eber, Hengst, Bulle,

Kaninchen und Maus (Arienti et al. 1997c; Arienti et al. 1999; Arvidson et al. 1989; Brouwers et al. 2013; Piehl et al. 2006; Arienti et al. 1998c; Girouard et al. 2011; Schwarz et al. 2013; Davis und Hungrund 1976; Mourvaki et al. 2010b; Castellini et al. 2006; Rejraji et al. 2006).

Die R_f -Werte, die zur Beschreibung des Laufverhaltens der aufgetrennten Lipidsubstanzen dienten, stimmten im Falle von Phosphatidylethanolamin und Cholesterol für Standards und Vesikelproben überein. Zwischen den Standardbanden von Sphingomyelin und Phosphatidylcholin und den Banden, die als Analoga in der Probe identifiziert wurden, zeigten sich geringgradige Abweichungen. Diese sind höchstwahrscheinlich durch den Einsatz spezieisfremder Standardlipide zu erklären.

Auffällig war eine starke Streuung der quantitativen Lipidwerte, die sich optisch auch ohne densitometrische Messung an der unterschiedlichen Intensität von gleichwertigen Banden verschiedener Individuen beobachten ließ. In der Literatur sind interindividuelle Unterschiede im Phospholipidgehalt von humanen Spermien und Seminalplasma beschrieben, die nicht auf methodische Fehler oder enzymatische Lipidspaltung zurückzuführen waren (Poulos und White 1973), sodass auch in der vorliegenden Forschungsarbeit interindividuelle Unterschiede als Erklärung in Betracht zu ziehen sind. Starke Differenzen bei der Bestimmung des humanen, vesikulären Gesamtpospholipidgehalts sowie des Cholesterolgehalts in zwei unterschiedlichen Studien der gleichen Forschergruppe unterstützen diese Annahme (Arienti et al. 1997c; Arienti et al. 1999). Ebenso existieren stark unterschiedliche Werte bezüglich des Cholesterolgehalts in vesikulären Strukturen des Kaninchenejakulats (Davis und Hungrund 1976; Mourvaki et al. 2010b). Weitere Einflussfaktoren auf die vesikuläre Lipidzusammensetzung, wie Rasse oder Ernährung, sind möglich. Wie weiter unten beschrieben, geben die Messergebnisse des vesikulären Cholesterolgehalts außerdem Anlass zu der Vermutung einer Körpergewicht-abhängigen Vesikelzusammensetzung beim Rüden (siehe unten). Die geringe Probandenzahl ist ebenfalls in diesem Zusammenhang zu bedenken. Vor dem Hintergrund der Identifikation unterschiedlicher morphologischer Vesikeltypen, die sich eventuell in Funktion und Zusammensetzung unterscheiden, könnte eine individuelle Variation in der Häufigkeit der unterschiedlichen Vesikeltypen bei geringer Probandenzahl stark zum Tragen kommen und für die starke Streuung der gemessenen Werte mit verantwortlich sein.

Der gemessene, mittlere, vesikuläre Cholesterolgehalt lag für den Rüden bei $0,078 \times 3,02^{\pm 1}$ μg Cholesterol/ μg Vesikelprotein. Im Vergleich zu entsprechenden Werten von Mensch

(Arienti et al. 1997c; Arienti et al. 1999), Eber (Piehl et al. 2006), Hengst (Arienti et al. 1998) und Bulle (Schwarz et al. 2013), deren mittlere, vesikuläre Cholesterolgehalte im Bereich von 0,13-0,3 µg Cholesterol/µg Vesikelprotein liegen, erscheint der canine Wert sehr gering. Er befindet sich auf ähnlichem Niveau wie der Wert des Kaninchens, der nach Mourvaki et al. (2010b) bei 0,072 µg Cholesterol/µg Vesikelprotein liegt, wobei Davis et al. (1976) für die gleiche Spezies Werte von 0,14 bis 0,26 µg Cholesterol/µg Vesikelprotein ermittelten. Laut Mourvaki et al. (2010b) ist das Hauptsterol der kunikulären Vesikel nicht Cholesterol, sondern Desmosterol, ein direkter Vorläufer von Cholesterol. Auch für den Rüden wäre eine solche Möglichkeit nicht ausgeschlossen, da der Desmosterolgehalt der Vesikel nicht untersucht wurde. Aufgrund der geringen Probandenzahl und der starken Streuung erscheint jedoch eine Betrachtung der Einzelwerte sinnvoll. Auffällig ist, dass die Rüden mit dem geringsten Körpergewicht (Rüde 1 und 2; 10,8 bzw. 8,5 kg) die höchsten Messwerte zeigten, während die niedrigen Messwerte ($\leq 0,1$ µg Cholesterol/µg Vesikelprotein) von Rüden eines Körpergewichts von 27-80 kg stammten. Dabei wies einer der schwersten Probanden (Rüde 11) den niedrigsten Extremwert (0,008 µg Cholesterol/µg Vesikelprotein) auf. Für 5 der 11 normospermen Rüden (4 Rüden eines Körpergewichts von 8,5-18 kg (Nr. 1, 2, 3, 6) und ein Rüde (Nr. 18) mit einem Körpergewicht von 36 kg), deren Cholesterolgehalt gemessen wurde, lagen die Werte im Bereich von 0,14-0,24 µg Cholesterol/µg Vesikelprotein. Diese Rüden wiesen damit einen ähnlich hohen Cholesterolgehalt auf, wie er bei Mensch, Eber, Hengst und Bulle beschrieben ist und wie er für die Vesikel der meisten Spezies als typisch gilt. Daher ist es auch durchaus möglich, dass canine Vesikel ebenfalls einen hohen Cholesterolgehalt aufweisen, dies hier aber nicht deutlich wurde, weil die ausgewählten Rüden die Situation in der Gesamtpopulation eventuell nicht optimal widerspiegeln. Weiterhin könnte sich hier eine Abhängigkeit der Vesikelzusammensetzung vom Körpergewicht abbilden. Dies ist jedoch nicht hinreichend belegt und bedarf weiterer Untersuchung.

Die Plasmamembran von Spermien enthält vergleichsweise wenig Cholesterol, was sich bei Mensch, Maus, Eber, Hengst, Hahn und Bulle in einem niedrigen molaren Cholesterol-Phospholipid-Verhältnis im Bereich von 0,24-0,45 äußert (Arienti et al. 1999; Rejraji et al. 2006). Werte zur Lipidzusammensetzung der caninen Spermienplasmamembran liegen nicht vor, weshalb ein direkter Vergleich hier nicht möglich ist. In vesikulären Strukturen des Ejakulats wurden bei Mensch, Hengst und Eber dagegen sehr viel höhere Werte (1,7-2,2)

gemessen (Arienti et al. 1998; Piehl et al. 2006; Arienti et al. 1999). Ein hohes molares Cholesterol-Phospholipidverhältnis steht im Zusammenhang mit einer erniedrigten Membranfluidität (Costanzo et al. 1994). Daher werden die Vesikel als membranstabilisierende Faktoren diskutiert, die durch Lipidtransfer auf die Spermienmembran deren Cholesterolgehalt und damit das molare Cholesterol-Phospholipidverhältnis erhöhen (Castellini et al. 2006; Carlini et al. 1997). Für den Ablauf der Kapazitation ist ein Cholesterol-Efflux zur Erhöhung der Membranfluidität der Spermien essentiell (Jonge 2006). Es ist bekannt, dass ein Zusatz von Cholesterol zu Kapazitationsmedium die Kapazitation der Spermien hemmt, wohingegen Cholesterolakzeptoren die Kapazitation in vitro induzieren (Visconti et al. 1999). Verschiedene Studien zur vesikulären Wirkung auf Spermien belegen analog dazu eine Inhibition der Kapazitation und der spontanen Akrosomreaktion (Pons-Rejraji et al. 2011; Mourvaki et al. 2010b; Collodel et al. 2012). Damit käme einem hohen vesikulären Cholesterolgehalt bzw. den Vesikeln in diesen Bereichen der Spermienphysiologie eine wichtige, regulierende Bedeutung zu, wobei unter anderem eine vorzeitige Akrosomreaktion durch die Vesikel verhindert würde. Zur Verifizierung der Situation beim Rüden sollten sich aus diesem Grund weitere Studien hinsichtlich des vesikulären Einflusses auf Vorgänge, wie Kapazitation und Akrosomreaktion, in Zukunft anschließen.

Cholesterol (und damit vermutlich auch cholesterolhaltige Vesikel) hat bei verschiedenen Spezies zusätzlich einen protektiven Effekt auf Spermien bei der Kryokonservierung hinsichtlich des Anteils motiler Spermien und der Membranintegrität (Moce et al. 2010), was in der vorliegenden Arbeit unter anderem Motivation für den Zusatz von Vesikeln zu caninem Tiefgefriersperma war. Anhand der hier durchgeführten Versuche konnte der Schutzeffekt allerdings nicht bestätigt werden, was eventuell mit dem eher niedrigen Cholesterolgehalt der vesikulären Strukturen des Rüden zu erklären ist.

Die Cholesterolgehalt von Rüde 17 (Hypokinozoospermie) mit 0,010 µg Cholesterol/µg Vesikelprotein war zwar mit einer der niedrigsten, gemessenen Cholesterolwerte, jedoch zeigten auch fertile Probanden niedrige Cholesterolgehalte, sodass aus diesem Einzelfall keine Schlüsse gezogen werden können.

Beim Menschen findet sich ein deutlicher Unterschied zwischen der Phospholipidzusammensetzung der Spermienmembran und derjenigen der vesikulären Membran. Während die Plasmamembran der Samenzellen vergleichsweise viel

Phosphatidylethanolamin und -cholin enthält, die den Hauptanteil der Phospholipide ausmachen, ist der Anteil an Sphingomyelin gering (Poulos und White 1973; Grizard et al. 2000). In der Vesikelmembran finden sich umgekehrte Verhältnisse (Arienti et al. 1999; Arienti et al. 1997c).

Der direkte Vergleich der hier gemessenen Phospholipidwerte mit denjenigen aus der Literatur ist schwierig, da diese bis auf Ausnahmen meist nur als prozentualer Anteil am Gesamtlipidphosphorgehalt ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ Vesikelprotein) der Vesikel angegeben sind. Dieser Gesamtwert liegt für den Rüden nicht vor, sodass eine prozentuale Angabe der Phospholipidanteile nicht möglich ist. Zur Quantifizierung des Gesamtlipidphosphorgehalts erfolgte in den Fällen anderer Spezies eine Bestimmung nach Bartlett (Bartlett 1959). Dies umfasste eine Zersetzung der Phospholipide in anorganisches Phosphat und eine optische Dichtemessung nach Komplexbildung des erhaltenen anorganischen Phosphats mit Ammoniummolybdänblau. Mit Hilfe einer Standardkurve bekannter Phosphat-Konzentration (bzw. damit auch bekannter Phosphorkonzentration) wurde die Phosphat-bzw. Phosphorkonzentration der Proben ermittelt. Das Molekulargewicht von Phosphor beträgt etwa 30,97 g/mol. Wenn man auf dieser Basis die relativen Phospholipidwerte aus der Literatur in absolute Angaben (μg Phospholipid/ μg Vesikelprotein) umrechnet, erhält man für die Spezies Mensch (Arienti et al. 1997c), Eber (Piehl et al. 2006), Hengst (Arienti et al. 1998), Bulle (Schwarz et al. 2013) und Kaninchen (Davis und Hungrund 1976) mittlere Phospholipidkonzentrationen im Bereich von 0,0019–0,1298 μg Phosphatidylethanolamin/ μg Vesikelprotein, 0,00085–0,04325 μg Phosphatidylcholin/ μg Vesikelprotein und 0,0025–0,1298 μg Sphingomyelin/ μg Vesikelprotein. Vergleicht man diese absoluten Werte mit denen des Rüden fällt auf, dass für Phosphatidylethanolamin (geometrisches Mittel: 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ Vesikelprotein, Spannweite: 0,060–0,500 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ Vesikelprotein) und Phosphatidylcholin (geometrisches Mittel: 0,052 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ Vesikelprotein, Spannweite: 0,009–0,160 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ Vesikelprotein) höhere Konzentrationen in caninen Vesikeln gemessen wurden als in denjenigen anderer Spezies, während Sphingomyelin (geometrisches Mittel: 0,076 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ Vesikelprotein, Spannweite: 0,021–0,200 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ Vesikelprotein) eher im mittleren Bereich der bisher bekannten Werte liegt. Generell unterscheiden sich die Werte unterschiedlicher Spezies stark. Es ist allerdings anzumerken, dass ein Unterschied zwischen der Betrachtung absoluter Werte und relativer Angaben besteht. Dies fällt beispielsweise beim Vergleich von Werten des Ebers (Piehl et al. 2006) und

des Hengstes (Arienti et al. 1998) auf. Während die absoluten Konzentrationsangaben für Phosphatidylethanolamin (0,0034 vs. 0,0021 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ Vesikelprotein) und Sphingomyelin (0,0043 vs. 0,0025 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ Vesikelprotein) sich relativ stark unterscheiden, fällt diese Differenz bei der Betrachtung der relativen Daten für Phosphatidylethanolamin (31 vs. 32% des Gesamtlipidphosphors) und Sphingomyelin (39 vs. 38% des Gesamtlipidphosphors) nicht besonders auf.

Da die relative Betrachtungsweise die Daten unabhängig von der Messgröße Vesikelprotein beschreibt und mengenmäßige Relationen der Substanzen zueinander letztendlich die physiologische Funktion bestimmen, erscheint letztere Datendarstellung sinnvoller als ein reiner Vergleich absoluter Einzelwerte. Daher kann aus den vorliegenden absoluten Daten zwar geschlossen werden, dass die caninen Vesikel bezogen auf das Vesikelprotein eine relativ hohe Phospholipidkonzentration aufweisen. Die Bedeutung bleibt jedoch offen.

Im Gegensatz zu anderen Spezies konnte Sphingomyelin nicht als Hauptkomponente der Vesikel nachgewiesen werden, da Phosphatidylethanolamin um einiges höher konzentriert vorlag. Ob Phosphatidylethanolamin damit das Hauptphospholipid der Vesikel ist oder ob ein nicht untersuchtes, anderes Phospholipid in noch höherer Konzentration in den Vesikeln existiert, muss in zukünftigen Studien abgeklärt werden. Bei der Hälfte der Probanden zeigte sich ein niedriges Sphingomyelin-Phosphatidylethanolamin-Verhältnis (0,39-0,58), was sich stark von den anderen Spezies unterschied, die ein hohes Verhältnis aufweisen (>1) (Davis und Hungrund 1976; Arienti et al. 1998; Piehl et al. 2006; Arienti et al. 1997c; Schwarz et al. 2013). Das Verhältnis von Phosphatidylcholin zu Phosphatidylethanolamin war ebenfalls relativ niedrig. Dies stimmt jedoch mit Ergebnissen des Kaninchens (leichte Vesikel) (Davis und Hungrund 1976), des Hengstes (Arienti et al. 1998) und des Ebers (Piehl et al. 2006) überein. Das hohe Phosphatidylcholin-Sphingomyelin-Verhältnis, das bei mehr als der Hälfte der Probanden vorlag, gleicht dem der Vesikel des Bullen (Schwarz et al. 2013), wohingegen das Verhältnis bei anderen Spezies niedriger ausfällt (Davis und Hungrund 1976; Arienti et al. 1998; Piehl et al. 2006; Arienti et al. 1997c).

Die Interpretation der caninen Phospholipidgehalte hinsichtlich der vesikulären Funktion bei Kontakt mit den Spermien bedarf neben einer Ermittlung des Gesamtlipidgehalts zur anteiligen Einordnung der hier erhaltenen Werte weitere Informationen über die Zusammensetzung der caninen Spermienmembran, die aktuell Forschungsgegenstand einer anderen Dissertation sind (Characterization of the lipid content of canine sperm membrane

of normal motility and asthenospermic spermatozoa at different stages of sperm maturation, in the ejaculate and after cryopreservation, Cristina de Fátima Lúcio, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Sao Paulo, Brasilien).

Die Funktionen der einzelnen Phospholipide in der Spermienphysiologie sind darüber hinaus noch nicht vollständig erforscht. Phosphatidylethanolamin, das in caninen Vesikeln in hoher Konzentration vorlag, unterstützt die Membranfusion (Yeagle 1989; Vardjan et al. 2013) und könnte daher bei der Interaktion zwischen vesikulären Strukturen und Samenzellen eine wichtige Rolle spielen. Außerdem wurde bei infertilen Männern mit erhöhtem Anteil an pathomorphologisch veränderten Spermienzellen im Vergleich zu fertilen Ejakulatsproben ein stark erniedrigter Phosphatidylethanolamingehalt der Spermien festgestellt, was eine wichtige Bedeutung des Phospholipids für die normale Spermienfunktion vermuten lässt (Gulaya et al. 2001).

Von Sphingomyelin ist bekannt, dass es einen Einfluss auf die Kapazitation hat, weil es den Cholesterol-Efflux hemmt. Dies könnte zusammen mit der Wirkung von vesikulärem Cholesterol den inhibierenden Effekt der Vesikel auf die Kapazitation erklären, der bei vielen Spezies beobachtet wurde (Pons-Rejraji et al. 2011; Mourvaki et al. 2010b; Collodel et al. 2012) und gibt außerdem Hinweise auf eine mögliche, fertilitätsrelevante Funktion der Vesikel im caninen Ejakulat. Zudem hat Ceramid, das nach Spaltung des Sphingomyelins durch Sphingomyelinase entsteht, einen förderlichen Effekt auf die Kapazitation (Cross 2000). Poliakov et al. (2009) konnten in den vesikulären Strukturen des Menschen ein Enzym zur Sphingomyelin-Spaltung nachweisen. Falls dies auch beim Rüden in den vesikulären Partikeln existiert, könnte diesen zusätzlich eine regulatorische Funktion im Rahmen der Fortpflanzungsprozesse zukommen, die sich je nach Enzymaktivität förderlich oder inhibierend auf die Kapazitation auswirkt. Dies wiederum wäre eine Erklärung für die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse hinsichtlich der Wirkung der Vesikel auf Kapazitation und Akrosomreaktion in der Literatur (siehe Kapitel 2). Poliakov et al. (2009) vermuten auf der Basis der Ceramidproduktion außerdem die Grundlage für den Bildungsmechanismus sekundärer Vesikel (innerhalb eines Primärvesikels), wie er für murine oligodendrogliale Zellen im Zusammenspiel mit Ceramid beschrieben ist (Trajkovic et al. 2008). Dieser Mechanismus könnte auch den hier beschriebenen „gefüllten“ Vesikeln zugrunde liegen und deren Entstehung erklären.

Phosphatidylcholin, das in den caninen Vesikeln im Vergleich zu den restlichen, untersuchten Phospholipiden in geringer Konzentration vorlag, hat einen positiven Einfluss auf die Akrosomreaktion (Cross 1994) und verringert beim Schafbock die spermienzellschädigende Wirkung durch Kälteeinfluss (Simpson et al. 1986). Das Phosphatidylcholin–Sphingomyelin–Verhältnis, das bei Anstieg eine Erhöhung der Membranfluidität zur Folge hat (Hise et al. 1986), beeinflusst darüber hinaus die Rigidität der Membran, was sich wiederum-abhängig von der Phospholipidverteilung in der Spermienzellmembran beim Rüden-bei vesikulärem Lipidtransfer auf die Keimzellen regulierend auf Vorgänge, wie Kapazitation und Akrosomreaktion, auswirken könnte.

5.3.4 Tiefgefrierversuch

Der Anteil motiler bzw. lebender Samenzellen in Proben, die mit Vesikeln eingefroren wurden (Gruppe 2), lag knapp nicht signifikant ($p=0,0555$) bzw. signifikant ($p=0,0005$) niedriger als in vesikelfreien Proben (Gruppe 1) oder solchen, die erst nach dem Auftauvorgang mit Vesikeln in Kontakt kamen (Gruppe 3). Dagegen waren die Ergebnisse bezüglich dieser Messgrößen in Gruppe 1 und 3 ähnlich. Die Werte der Parameter der subjektiv und objektiv geschätzten Vorwärtsbeweglichkeit zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Allerdings legten Spermien aus Gruppe 2 zum Messzeitpunkt 10 Minuten nach dem Auftauvorgang einen signifikant höheren Weg (CASA–Streckenparameter DAP, DCL, DSL) in höherer Geschwindigkeit (CASA–Geschwindigkeitsparameter VAP, VCL, VSL) zurück als Spermien der anderen Gruppen, sodass hier ein Einfluss der Vesikel auf spezifische Eigenschaften der Spermienbewegung deutlich wurde. Sonstige CASA-Parameter (STR, LIN, WOB, ALH, BCF), Messparameter der Membranintegrität (HOS–Test) und Pathomorphologie (Spermac®-Ausstrich) ließen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen erkennen. Es gab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen Proben unterschiedlicher vesikulärer Konzentrationen, wie sie im Rahmen des zweiten Teils des Tiefgefrierversuchs untersucht wurden. Jedoch bestanden hier signifikante Interaktionen zwischen den untersuchten Faktoren Vesikelkonzentration und Zeit, die Hinweise auf einen zeitabhängigen Effekt der Vesikelwirkung in Abhängigkeit von der Vesikelkonzentration gaben.

Sowohl im ersten (3 Gruppen, unterschiedlicher Zeitpunkt der Vesikelzugabe bzw. keine Vesikelzugabe) als auch im zweiten Versuchsteil (3 Gruppen unterschiedlicher vesikulärer

Konzentrationen) wurden für folgende Parameter signifikante Unterschiede (Reduktion der Werte mit fortschreitender Zeit) über die Zeit deutlich: Subjektiv ($p \leq 0,0001$) und objektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit, DAP, DSL, VAP, VSL, LIN, STR, WOB, Anteil lebender sowie Anteil membranintakter Spermienzellen (Versuchsteil 1) und CASA-Gesamtmotilität, subjektiv geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit ($p \leq 0,0001$), DAP, DSL, VSL, LIN und STR (Versuchsteil 2). Diese Ergebnisse sind durch die physiologische, zeitabhängige Reduktion der Spermienmotilität (Elzanaty und Malm 2007; Chomsrimek et al. 2008) sowie die zeitlich begrenzte Lebensfähigkeit der Spermien zu erklären und waren deshalb zu erwarten. Daher werden sie im Folgenden nicht weiter diskutiert.

Die Anwesenheit der Vesikel scheint sich bei Zusatz vor dem Einfriervorgang (Gruppe 2) eher negativ als protektiv auf den Gesamtanteil motiler bzw. lebender Spermienzellen nach dem Auftauen auszuwirken. In der Literatur gibt es bisher keine direkt vergleichbaren Studien, da die vesikuläre Wirkung auf humanes Tiefgefriersperma nur durch Zusatz von Vesikeln nach dem Auftauen getestet wurde (Carlsson et al. 1997).

Mögliche Ursachen zur Erklärung dieses Sachverhalts sind folgende: Eine Schädigung der Spermienzellen und/oder der Vesikel durch Einsatz des Silikatmediums und durch die Kryokonservierung, eine Störung der vesikulären Funktion oder der Spermien-Vesikel-Interaktion infolge des Tiefgefriervorganges, eine ineffiziente Vesikelkonzentration, rassespezifische bzw. individuelle Einflüsse sowie eine geringe Probandenzahl.

Ein Vesikelzusatz nach dem Auftauen (Gruppe 3) zeigte in der vorliegenden Studie zwar eine leichte Erhöhung der Gesamtmotilität zum Zeitpunkt 10 Minuten nach Messbeginn, aber keinen signifikanten Unterschied zur vesikelfreien Kontrollgruppe. Auch bezüglich des Anteils lebender Samenzellen waren die Werte in Gruppe 1 und 3 sehr ähnlich. Daraus könnte man folgern, dass eine Vesikelzugabe nach dem Auftauen keinen Effekt auf die Spermien hat. Dies steht teilweise im Widerspruch zur Literatur, wo für Mensch, Bulle und Kaninchen motilitätsfördernde Eigenschaften der vesikulären Partikel beschrieben sind (Stegmayr und Ronquist 1982a, 1982b, Arienti et al. 1999a; Fabiani et al. 1994a; Carlsson et al. 1997; Agrawal 1987; Collodel et al. 2012; Castellini et al. 2013). Andere Forscher wiederum fanden in ihren Studien an Sperma des Schafbocks keine (Ghaoui et al. 2007) bzw. an Ebersperma nur sporadische (Piehl et al. 2013) vesikuläre Effekte auf die Spermienmotilität. Somit sind auch speziesabhängige Unterschiede nicht auszuschließen.

Wie oben erwähnt, waren die hier eingesetzten Vesikelkonzentrationen im Vergleich zu Studien aus dem Humanbereich sehr niedrig (Fabiani et al. 1994b). Die für einen physiologischen Effekt relevante Vesikelkonzentration beim Rüden ist unbekannt. Somit ist es möglich, dass das Konzentrationsniveau in der vorliegenden Studie zu niedrig war, um eine Wirkung, die eventuell bei höherer Konzentration eingetreten wäre, zu erzielen.

Eine individuelle Betrachtung der Werte der Gesamtmotilität der einzelnen Probanden unterstützt diese Vermutung und lässt außerdem spekulieren, dass es hinsichtlich der Konzentrationsoptima rasse- bzw. eventuell auch körpergröße-spezifische Unterschiede zwischen den Rüden geben könnte.

Während die Rüden Nummer 9 (Rottweiler), 25 und 26 (beide Labrador Retriever) das oben genannte Ergebnis der niedrigen Gesamtmotilität in Gruppe 2 deutlich widerspiegeln, finden sich bei den Rüden Nummer 29 (Bearded Collie), 30 (Golden Retriever) und 31 (Schwarzer Schäferhund) entweder nur geringfügige Erniedrigungen der Gesamtmotilität (Gruppe 2 relativ zu Gruppe 1 und 3) oder solche, die auf bestimmte Messpunkte beschränkt bleiben und zu anderen Zeitpunkten nicht erkennbar sind. Die Rüden Nummer 21 und 27 (beide Golden Retriever) zeigen relativ ähnliche Werte für alle Gruppen ohne deutliche Unterschiede. Die Werte der Rüden Nummer 1 und 28, die einzigen beiden Vertreter eher kleiner Hunderassen, zeigen keine Unterlegenheit der zweiten Gruppe. Im Gegensatz weisen die Werte von Rüde 1 sogar eine deutliche Überlegenheit der Gruppen 2 und 3 gegenüber der ersten Gruppe auf. Von den größeren Hunderassen weisen nur die Rüden 25 und 26 eine Überlegenheit der Gruppe 3 über die Kontrollgruppe auf.

Dies belegt zum einen, dass offenbar individuelle Unterschiede im Hinblick auf die Vesikelmwirkung bestehen. Ein Einfluss der Rassezugehörigkeit sowie des Körpergewichts sind ebenfalls möglich. Man könnte auch mutmaßen, dass größere Rassen, die physiologischerweise ein höheres Ejakulatsvolumen, damit einhergehend vermutlich auch ein höheres Vesikelvolumen aufweisen, für nachweisbare Wirkungen auf höhere Vesikelkonzentrationen angewiesen sind und der in dieser Studie rassenunabhängig festgelegte, relativ niedrige Wert zu niedrig für einen detektierbaren Einfluss auf die Spermien ist. Im zweiten Teil des Versuchs wäre dementsprechend für größere Hunderassen bei Annäherung an physiologische Konzentrationen ein Anstieg der Werte mit steigender Konzentration zu erwarten. Dieser Sachverhalt findet sich bei den Werten der Rüden Nummer 9, 29 und 30 sowie bei 25 und 27 gegen Ende der Messungen. Rüde 31

allerdings liefert mit höheren Konzentrationen niedrigere Werte, was der Hypothese widerspricht. Daher ist es auch möglich, dass ein bestimmtes, rasseunabhängiges Vesikel-Spermien-Verhältnis für optimale Bedingungen ausreicht, das hier aber nicht erreicht war. Zukünftige Untersuchungen mit höherer Probandenzahl sind zur Erlangung weiterer Hinweise ratsam.

Bei der Betrachtung der gemessenen Werte muss man bedenken, dass die Messungen Momentaufnahmen der jeweiligen Spermieeigenschaften sind. Die leichte Erhöhung der mittleren Messwerte nach 10 Minuten in Gruppe 3 gegenüber der Kontrollgruppe lässt daher Platz für Spekulationen. So könnte es sein, dass eine Vesikel-Spermien-Interaktion nach dieser Zeit erst beginnt, ihre Wirkung zu entfalten, und im Zeitraum zwischen der zweiten und dritten Messung einen weiteren Werteanstieg auslöste, der durch das hier eingesetzte Studiendesign nicht detektiert werden konnte. Deshalb sollte man in zukünftigen Untersuchungen darauf achten, die Anzahl der Messungen im betreffenden Zeitfenster zu erhöhen.

Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen fielen im Gegensatz zu Ergebnissen aus der Literatur (Fabiani et al. 1994a) keine signifikanten Wirkungen der Vesikel auf den subjektiv und objektiv erfassten Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien auf. Entweder haben canine Vesikel keinen Effekt auf diesen Parameter oder die eventuell von der Situation in vivo abweichenden Studienbedingungen (Vesikelkonzentration) ließen einen Nachweis nicht zu.

Bezüglich der Messungen des Anteils der Vorwärtsbeweglichkeit ist auffällig, dass der mittlere Anteil progressiv beweglicher Spermien direkt nach dem Auftauen in allen Gruppen sehr gering war (24-32%) und nach relativ kurzer Zeit (30 Minuten) fast keine Vorwärtsbeweglichkeit mehr zu beobachten war (4-6%), während die Werte in anderen Studien ähnlicher, aber vesikelunabhängiger Spermienbehandlung um einiges höher liegen (Prinosilova und Kopecka 2012). Wie schon erwähnt, liegt die Ursache vermutlich im Vorgang der Dichtegradientenzentrifugation, der damit einhergehenden langen Zentrifugationsdauer (mechanische Zellschädigung) und der Interaktion zwischen Silikatmedium und Spermienzellen, die eine höhere osmotische und Temperaturempfindlichkeit zur Folge haben könnten. Eventuell spielen auch eine Veränderung des pH-Wertes durch das Dichtegradientenmedium und der Einsatz des PBS-Puffers (Schäfer-Somi und Aurich 2007) eine Rolle. Möglicherweise werden diese Effekte durch

individuelle Aspekte (England 1993; Yu et al. 2002) sowie die physikalische Belastung des Einfrier- und Auftauvorgangs (Songsasen et al. 2002; Stănescu 2012) verstärkt und führen gemeinsam zur Ausprägung eines multifaktoriellen Geschehens, das in einer erheblichen Motilitätsreduktion resultiert. Fehler bei der Samengewinnung oder bei der Aufarbeitung der Spermien für die Kryokonservierung konnten ausgeschlossen werden.

Insgesamt ist das hier eingesetzte Protokoll zur Aufarbeitung der Spermien für einen Einsatz in der Praxis aufgrund der enormen Motilitätsreduktion definitiv noch nicht zu empfehlen. Weitere Studien zur Modifikation sind erforderlich.

Beim Vergleich der subjektiven und objektiven Schätzungen des Anteils vorwärtsbeweglicher Spermien fällt auf, dass die Werte des objektiv erfassten Parameters fast immer niedriger lagen. Sowohl eine Über- (Tejerina et al. 2009; Broekhuijse et al. 2011; Klaus 2012) als auch eine Unterschätzung (Schäfer-Somi und Aurich 2007; Yeung et al. 1997) der computergestützten Ursachen für diese Differenzen können die hohe Genauigkeit automatischer Messsysteme und unterschiedliche Geräte- bzw. Softwareeinstellungen in Kombination mit der Variabilität in der Beurteilung der Proben durch unterschiedliche Untersucher (Broekhuijse et al. 2011) sein. Obwohl subjektiv und objektiv erfasste Einzelwerte bezüglich der progressiven Spermienmotilität in der vorliegenden Arbeit nicht direkt vergleichbar waren, zeigte sich bei der zweifaktoriellen Varianzanalyse jedoch eine übereinstimmende Tendenz in der Aussage der Werte, sodass die Unterschiede durch die subjektive Über- bzw. objektive Unterschätzung im Detail vernachlässigt werden konnten. Da es unklar ist, ob es sich bei diesem Sachverhalt letztendlich um eine Unterschätzung des Computersystems oder eine Überschätzung seitens des Untersuchers handelt, erscheint es jedoch generell-vor allem bei studienunabhängiger, einmaliger Routineuntersuchung von Proben-sinnvoll, stets subjektive und objektive Werte zugleich zu erfassen und im Hinblick auf das Gesamtbild kritisch zu hinterfragen, um die Gesamtsituation angemessen interpretieren zu können.

Im Gegensatz zu den oben diskutierten Ergebnissen der Gesamtmotilität und des Anteils lebender Spermien, die beim Zusatz von Vesikeln vor der Kryokonservierung einen eher negativen Effekt der Vesikel auf die Spermien andeuteten, fand sich bezüglich der Strecken- und Geschwindigkeitsparameter in Gruppe 2 eine signifikante Überlegenheit über die anderen Gruppen zu den Zeitpunkten 0 und 10 Minuten nach dem Auftauvorgang und eine

leichte Erhöhung der mittleren Werte der Gruppe 3 gegenüber der Kontrollgruppe 10 Minuten nach dem Messbeginn.

Unterschiedliche Studien für verschiedene Spezies belegen eine positive Korrelation der Parameter VCL, VSL, VAP mit der Fertilität (Hirano et al. 2001; Marshburn et al. 1992; Vicente-Fiel et al. 2014). Auch Rüden mit niedriger Fertilität wiesen in einer Untersuchung signifikant niedrigere Messwerte auf als solche guter Fertilität, sodass man ebenfalls eine positive Korrelation vermuten kann (Rijsselaere et al. 2007). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine Zugabe von Vesikeln vor dem Einfrieren einen positiven Effekt auf das Bewegungsmuster der Keimzellen hat.

Beim Menschen ist bekannt, dass im Zuge der vesikulären Fusion mit Spermien ein Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration in den Samenzellen ausgelöst wird (Palmerini et al. 1999). Calcium spielt eine entscheidende Rolle im Rahmen der Spermienmotilität (Ho und Suarez 2001). Daher wäre auch beim Rüden ein ähnlicher Vorgang nach Spermien-Vesikel-Interaktion denkbar. Beim Menschen ist der genaue molekulare Mechanismus des vesikulären Einflusses auf die Spermienmotilität noch nicht vollständig geklärt. Die Rolle zahlreicher anderer vesikeleigener Substanzen, die in Kapitel 2 ausführlich aufgeführt sind und die auf die Spermien transferiert werden könnten, wird diskutiert. Bisher bekannte Übereinstimmungen des Vesikelproteoms von Mensch und Hund (Ronquist et al. 2013b), wie unter anderem das Vorkommen glykolyse-assoziiierter Proteine oder der Dipeptidylpeptidase IV (EC 3.4.14.5), lassen Gemeinsamkeiten hinsichtlich des molekularen Mechanismus und des Vesikelaufbaus bzw. des Substanztransfers vermuten. Allerdings stehen wissenschaftliche Belege aus.

Weiterhin stellt sich jedoch die Frage, warum die positive Vesikelwirkung auf die Spermien nur in Gruppe 2 bei Vesikelzugabe vor dem Einfriervorgang signifikant deutlich wurde (0 und 10 Minuten nach Messungsbeginn) und Gruppe 3 dagegen nur nicht signifikant leicht erhöhte, mittlere Messwerte aufwies. Nimmt man die Fusion oder den Substanztransfer als Grundlage der Vesikelwirkung an, so wäre es einerseits denkbar, dass dieser Vorgang einige Zeit dauert und deshalb in Gruppe 3 nicht zum Tragen kam, weil die Kontaktzeit zwischen Vesikel und Spermien zu kurz war. Geht man jedoch andererseits davon aus, dass der Wirkeffekt der Vesikel auf das Bewegungsmuster der Spermien nur kurzzeitig anhält, was die gegen Messungsende erniedrigten Werte in Gruppe 2 nahe legen, könnte es ebenso möglich sein, dass im Zeitraum zwischen der zweiten und dritten Messung (Dauer von 20 Minuten) in

Gruppe 3 ein deutliche Werteerhöhung eingetreten war, die 30 Minuten nach dem Auftauen schon nicht mehr detektierbar war. Um dies zu verifizieren, wären folglich kürzere Abstände zwischen den Messzeitpunkten in zukünftigen Studien sehr wichtig.

Nimmt man eine kurzzeitige Vesikelwirkung an, stellt sich darüber hinaus die Frage inwieweit die Veränderungen des Bewegungsmusters in vivo einen förderlichen Effekt auf die Fertilität haben können bzw. wäre es interessant zu erforschen, zu welchem Zeitpunkt und unter welchen Bedingungen die Vesikel auf die Spermien im weiblichen Genitaltrakt wirken, um die Ergebnisse aus in-vitro-Untersuchungen richtig interpretieren zu können.

An dieser Stelle ist zu betonen, dass aus den vorliegenden Ergebnissen keinesfalls direkte Rückschlüsse auf die Situation in vivo gezogen werden können, weil sich die Studienbedingungen massiv von den Bedingungen im Körper des Rüden oder beim Natursprung, wo Vesikel vermutlich ihre physiologische Wirkung entfalten, unterscheiden. Die caninen Vesikel könnten zudem andere Hauptfunktionen im weiblichen Genitaltrakt übernehmen, wie z.B. den Schutz der Spermien vor Immunangriffen sowie bei oxidativen Prozessen. Dadurch üben Vesikel eventuell beim Rüden einen indirekten Schutzeffekt auf spermatide Strukturen aus, der hier nicht erfasst werden konnte.

Durch den negativen Effekt auf Gesamtmotilität und Anteil lebender Spermien, der neben der Veränderung des Bewegungsmusters bei Kryokonservierung von Vesikeln und Spermien auftrat, scheinen Vesikel sowohl positive als auch negative Eigenschaften auf die Spermien zu haben. Beides nebeneinander erscheint zunächst kontrovers. Da Gruppe 3 diesen negativen Effekt jedoch nicht zeigt, ist anzunehmen, dass dieser mit den veränderten Bedingungen der Kryokonservierung in Verbindung steht, die oben schon mehrfach angesprochen wurden.

Bezüglich der restlichen CASA-Parameter (STR, LIN, WOB, ALH, BCF) ergaben sich in den vesikelhaltigen Gruppen keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe. Auch nach Konzentrationserhöhung bei Zugabe der Vesikel nach dem Auftauen (Studienteil 2) konnten keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur niedrigen Konzentration festgestellt werden. Daher liegt der Schluss nahe, dass die Vesikel bei der hier eingesetzten Konzentration keine Wirkung auf diese Kenngrößen haben. Ob dies allerdings mit der Situation in vivo oder bei deutlicher Erhöhung der Konzentration übereinstimmt bleibt offen. Humanen Vesikeln zumindest wird ein positiver Einfluss auf den Parameter der Amplitude der lateralen Kopfbewegung (ALH) zugeschrieben (Fabiani et al. 1994a).

Hinsichtlich pathomorphologischer Spermienveränderungen konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Daher ist anzunehmen, dass die caninen Vesikel nicht mit morphologischen Veränderungen der Spermien in Zusammenhang stehen.

Im Gegensatz zu Ergebnissen aus der Literatur, wo ein vesikulärer Einfluss auf die Kapazitation bzw. Akrosomreaktion der Spermien beschrieben ist (Palmerini et al. 2003; Pons-Rejraji et al. 2011), lieferten die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit keine derartigen Hinweise. Dies kann, wie oben erwähnt, an einer zu geringen Vesikelkonzentration oder der geringen Probandengröße liegen, jedoch kann es ebenso eine speziesspezifische Besonderheit sein, da auch in der Literatur zwischen den Spezies keine Übereinstimmung herrscht (Siciliano et al. 2008; Piehl et al. 2013; Agrawal 1987; Collodel et al. 2012).

Da für den Rüden bisher keine weiteren Erkenntnisse bezüglich der Vesikel bzw. ihrer physiologischen Aufgaben, Wirkungsorte und-mechanismen vorliegen, ist es schwer, die vorliegenden Ergebnisse weitergehend zu interpretieren. Die Erlangung von detaillierten Informationen zu einer möglichen Interaktion bzw. des genauen zeitlichen und biochemischen Ablaufes sind daher in Zukunft von entscheidender Bedeutung.

Vorsichtsmaßnahmen, wie sie in dieser Arbeit zur Vermeidung von unklaren, negativen Effekten getroffen wurden, wie der Einsatz ausschließlich frisch aufgereinigter oder körpereigener Vesikel, sind möglicherweise in der Praxis nicht nötig. Diese Option auf eine vesikuläre Konzentrationserhöhung in Praxis und Forschung und deren Wirkung sollten ebenfalls Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

5.4 Schlussbetrachtung und Fazit für die Praxis

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein geeignetes Aufreinigungsprotokoll für die Isolierung von Vesikel aus dem caninen Ejakulat etabliert. Auf dieser Grundlage geschah ergänzend zu bisher erfassten Daten von Zelli et al. (2013) bzw. Ronquist et al. (2013b) eine detaillierte Beschreibung der ultrastrukturellen Morphologie vesikulärer Strukturen aus dem Ejakulat des Rüden bei Normo-, Hypokino- und Azoospermie. Die Vesikelpopulation wurde in 11 unterschiedliche Vesikeltypen anhand morphologischer Kriterien, wie Struktur und Zusammensetzung des Inhalts, Vesikeldurchmesser und Form, eingeteilt und deren Verteilung ermittelt. Auffällig waren hierbei eine starke Reduktion der maximalen

Vesikeldurchmesser bei Infertilität und eine unterschiedliche Zusammensetzung der Vesikelpopulation bei Normo-, Hypokino- und Azoospermie, die erstmals beschrieben wurden. Das Vorhandensein der Vesikel im Ejakulat des azoospermen Rüden (Rüde 35, Kastrat) beweist, dass diese partikulären Strukturen zumindest zum Teil aus der Prostata Drüse stammen müssen. Biochemisch konnte, analog zu Daten aus der Literatur (Ronquist et al. 2013b), ein komplexes Proteinmuster nachgewiesen werden, das sich von dem Proteinmuster der Spermienzellen deutlich unterschied und Aktin als vesikulären Bestandteil umfasste. Zusätzlich konnte das Protein S100A9 erstmalig in den caninen Vesikelpollen identifiziert werden. Außerdem wurden Erkenntnisse über die vesikulären Lipide gewonnen, die neben einigen hier unidentifizierten Lipiden das Vorkommen von Phosphatidylethanolamin, Cholesterol, Sphingomyelin und Phosphatidylcholin in absteigender Quantität belegen. Obwohl ein direkter Vergleich zu Werten anderer Spezies aufgrund des fehlenden Gesamthospholipidwertes schwierig ist, lässt die quantitative Dominanz von Phosphatidylethanolamin einen Unterschied der caninen, vesikulären Lipidzusammensetzung im Hinblick auf die Situation bei anderen Spezies vermuten, wo Sphingomyelin zumeist als Hauptphospholipid beschrieben wurde und darüber hinaus – abgesehen vom Kaninchen-Cholesterol in deutlichen höheren Mengen in den vesikulären Strukturen vorlag (Arienti et al. 1999; Arienti et al. 1998; Piehl et al. 2006).

Der Zusatz von Vesikeln zu aufgetautem Tiefgefriersperma zeigte hinsichtlich der gemessenen Eigenschaften (Motilität, Membranintegrität, Vitalität) keine signifikanten Unterschiede zu vesikelfreien Spermienproben, während in der Literatur bei anderen Spezies über motilitätsfördernde Eigenschaften der Vesikel in Interaktion mit den Spermien berichtet wurde (Stegmayr und Ronquist 1982a, 1982b, Arienti et al. 1999a; Fabiani et al. 1994a; Carlsson et al. 1997; Agrawal 1987; Collodel et al. 2012; Castellini et al. 2013). Der fehlende Effekt kann entweder in einer Speziespezifität oder in einer zu niedrigen Vesikelkonzentration in der Studie begründet liegen, die jedoch aus materialtechnischen Gründen nicht weiter angehoben werden konnte. Bei Kryokonservierung der vesikelhaltigen Spermienproben ergab sich eine signifikante Erhöhung der Fortbewegungsgeschwindigkeit der Samenzellen (VAP, VCL, VSL) und der zurückgelegten Strecke (DAP, DCL, DSL), was einen positiven Einfluss dieser Behandlung auf das Bewegungsmuster der Spermien nahelegt. Gleichzeitig erhöhte sich jedoch in dieser Versuchsgruppe auch der Anteil immotiler bzw. toter Spermienzellen knapp nicht signifikant bzw. signifikant. Dies erscheint kontrovers und

könnte im Zusammenhang mit einem negativen Effekt des Isolierungsprotokolls der Spermien (Dichtegradientenzentrifugation mittels Silikatmedium vor der Kryokonservierung) stehen, das vermutlich auch für eine sehr niedrige Vorwärtsbeweglichkeit in allen Versuchsgruppen nach dem Auftauen verantwortlich war. Für den Einsatz in der Praxis ist das hier angewendete Protokoll aus diesem Grund noch nicht geeignet.

In Anbetracht der hier dargestellten ersten Hinweise auf einen positiven Einfluss der Vesikel auf die Samenzellen und der hohen vesikulären Bedeutung bei anderen Spezies ist jedoch davon auszugehen, dass auch die hier charakterisierten, caninen Vesikel einen entscheidenden Einfluss auf die Fortpflanzung beim Hund haben. Daher sollte diese Ejakulatskomponente unbedingt Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

5.5 Offene Fragestellungen

Die hier vorgestellte Studie ist bisher eine der wenigen, die sich mit vesikulären Strukturen des caninen Ejakulats beschäftigt. Somit liegen zwar relativ viele Daten zur Situation bei anderen Spezies vor, der Kenntnisstand beim Rüden über die Vesikel ist jedoch sehr gering. Während die ultrastrukturelle Vesikelmorphologie nun gut untersucht ist, steht eine Vervollständigung der Daten über die biochemische Vesikelzusammensetzung aus. Vor allem die hier erfassten Lipidwerte sollten in weiteren Studien anhand größerer Probandenzahlen verifiziert werden. Gleiches gilt für die Befunde bei infertilen Rüden ($n=3$), für die in der Literatur, abgesehen von dieser Arbeit, bisher keine Daten erhoben wurden. Offen ist, ob die Vesikelpopulation eine Mischung aus unterschiedlichen Geschlechtsdrüsen darstellt oder ob die Vesikel ausschließlich der Prostata entstammen. Unklar bleiben auch die tatsächlichen Funktionen der identifizierten Proteine und Lipide, über die hier nur spekuliert werden kann. Erste Erkenntnisse aus der Interaktion mit den Spermien, die sich aus dieser Studie ergeben, bedürfen darüber hinaus weiterer Erforschung. Dies gilt sowohl für die Wirkung von Vesikeln auf Tiefgefriersperma als auch für die Wirkung der Vesikel beim caninen Fortpflanzungsprozess im Allgemeinen. Beides könnte bei näherem Verständnis den gewinnbringenden Einsatz der Vesikel in der caninen Reproduktionstechnologie und in Diagnostik und Therapie der caninen Reproduktionsmedizin ermöglichen.

6 Zusammenfassung

Identifizierung und Charakterisierung vesikulärer Strukturen im caninen Ejakulat sowie Untersuchungen zu deren funktioneller Bedeutung

Bei vielen Spezies, darunter Mensch, Bulle, Pferd und Schwein, sind vesikuläre Strukturen als Bestandteil des Ejakulats schon lange Gegenstand der Forschung. Nach Beginn dieser Arbeit wurden zwei Studien publiziert, die sich erstmals mit Vesikeln aus dem caninen Ejakulat beschäftigten. Während vor allem beim Menschen zahlreiche Funktionen der Vesikel im Rahmen der Spermienphysiologie bekannt sind und man auch bei anderen Spezies von einem bedeutenden, vesikulären Einfluss auf die Fortpflanzungsprozesse ausgeht, ist der Kenntnisstand beim Rüden sehr gering. Dieser Hintergrund war Hauptmotivation für die vorliegende Arbeit, deren Ziel es war, grundlegende Erkenntnisse über den vesikulären Aufbau zu erlangen. Darüber hinaus sollten ein möglicher, gewinnbringender Einsatz im Rahmen der Kryokonservierung der Spermienzellen und damit die vesikuläre Funktion untersucht werden. Hierfür wurden Ejakulate von 35 Rüden (31 normosperme Rüden, 2 Rüden mit Hypokinozoospermie, 1 Rüde mit Pathospermie und 1 Rüde mit Azoospermie) lichtmikroskopisch (n=35), elektronenmikroskopisch (n=18), mittels SDS-PAGE (n=14), MALDI-TOF-MS-Analyse (n=6), HPTLC mit nachfolgender Iodfärbung und Densitometrie (Bestimmung der Phospholipide, n=14) und Cholesterol-Assay-Kit (n=12) untersucht. Außerdem wurden Spermienproben von 10 normospermen Rüden ohne (Gruppe 1) oder mit (Gruppe 2) Vesikeln tiefgefroren oder nach dem Auftauen mit Vesikeln versetzt (Gruppe 3). Zu den Zeitpunkten 0, 10 und 30 Minuten nach dem Auftauen erfolgte eine spermatologische Untersuchung mittels Lichtmikroskopie, CASA, HOS-Test, Eosin-Färbung (Lebend-/Tot-Verhältnis) und Spermac[®]-Färbung (Spermienmorphologie). In einem zweiten Versuchsteil wurden Spermienproben nach dem Auftauen unterschiedliche Vesikelmengen zugesetzt (0,05, 0,1 und 0,2 mg Vesikelprotein/ml) und die Ergebnisse der spermatologischen Untersuchung (0, 10 und 30 Minuten nach dem Auftauen) mittels Lichtmikroskopie und CASA verglichen.

Das Vorkommen der Vesikel im Ejakulat des Rüden konnte bei allen 35 Probanden unabhängig von deren Fertilitätsstatus lichtmikroskopisch bestätigt werden. Ultrastrukturell wurde die canine Vesikelpopulation anhand von morphologischen Kriterien in 11 Vesikeltypen eingeteilt, die sowohl bei fertilen als auch bei infertilen Rüden (Hypokino- und

Azoospermie, n=3) nachweisbar waren. Unterschiede zwischen fertilen und infertilen Gruppen ergaben sich im maximalen Vesikeldurchmesser (Normospermie: Mittel: 195 nm; Spannweite: 25-3289 nm, n=15; Hypokinozoospermie: Mittel: 196 nm; Spannweite: 21-2096 nm, n=2; Azoospermie: Mittel: 204 nm; Spannweite: 22-1314 nm, n=1) und in der Verteilung der Vesikeltypen. Es bleibt abzuklären, ob die morphologisch unterschiedlichen Vesikeltypen auch funktionell unterschiedlich sind und ob ein Zusammenhang der Vesikelverteilung zur Fertilität besteht. Durch Nachweis von Vesikeln im Ejakulat eines Kastraten (Rüde 35) konnte belegt werden, dass zumindest ein Teil der Vesikel seinen Ursprung in der Prostata hat. Die caninen Vesikel zeigten ein komplexes Protein- und Lipidmuster. Im Unterschied zu den Spermien, bei denen prominente Proteinbanden nach elektrophoretischer Auftrennung bei etwa <15 kDa und 25 kDa lagen, zeigten sich in den Vesikeln deutliche Proteinbanden im Bereich von etwa 17 und 40 kDa. Die Proteine Aktin und S100A9 wurden als vesikuläre Bestandteile identifiziert. Cholesterol, Phosphatidylethanolamin, Sphingomyelin und Phosphatidylcholin wurden aus Vesikelpuben isoliert und quantitativ gemessen ($\bar{x}_{geom} \times SF^{\pm 1}$: $0,078 \times 3,02^{\pm 1} \mu\text{g Cholesterol}/\mu\text{g Vesikelprotein}$, Spannweite: 0,009-0,244 $\mu\text{g Cholesterol}/\mu\text{g Vesikelprotein}$, n=11 bzw. $0,200 \times 1,83^{\pm 1} \mu\text{g Phosphatidylethanolamin}/\mu\text{g Vesikelprotein}$, Spannweite: 0,060-0,500 $\mu\text{g Phosphatidylethanolamin}/\mu\text{g Vesikelprotein}$, n=14 bzw. $0,076 \times 1,73^{\pm 1} \mu\text{g Sphingomyelin}/\mu\text{g Vesikelprotein}$, Spannweite: 0,021-0,200 $\mu\text{g Sphingomyelin}/\mu\text{g Vesikelprotein}$, n=14 bzw. $0,052 \times 2,17^{\pm 1} \mu\text{g Phosphatidylcholin}/\mu\text{g Vesikelprotein}$, Spannweite: 0,009-0,160 $\mu\text{g Phosphatidylcholin}/\mu\text{g Vesikelprotein}$, n=14). Dabei dominierte quantitativ Phosphatidylethanolamin, was im Unterschied zu Vesikeln anderer Spezies steht, bei denen Sphingomyelin das Hauptphospholipid ist. Interessant wäre hier eine qualitative und quantitative Erforschung der weiteren vesikulären Lipidbestandteile, um die Bedeutung der einzelnen Strukturen genauer einschätzen zu können.

Die Untersuchung der Wirkung der Vesikel auf Tiefgefriersperma (Parameter Motilität, Membranintegrität, Vitalität) ergab kontroverse Ergebnisse, die vermutlich durch methodisch erzeugte Artefakte (Dichtegradientenzentrifugation mittels Silikatmedium; zu niedrige Vesikellkonzentration) zu erklären sind. So zeigte sich bei Spermienproben, die vor der Kryokonservierung mit Vesikeln versetzt worden waren im Vergleich zu vesikelfreien Spermienproben und solchen, denen Vesikel erst nach dem Auftauvorgang zugesetzt worden waren, ein positiver Einfluss auf das Bewegungsmuster der Spermien in Form von

signifikant höheren Werten der CASA-Parameter DAP ($p=0,0107$), DCL ($p=0,0456$), DSL ($p=0,022$), VAP ($p=0,0053$), VCL ($p=0,0375$) und VSL ($p=0,0112$), jedoch gleichzeitig ein knapp nicht signifikant erhöhter Anteil an immotilen Samenzellen ($p=0,0555$) und ein signifikant erhöhter Anteil an toten Spermien ($p=0,0005$). Bei Zugabe von Vesikeln zu vesikelfreien Spermienproben nach dem Auftauvorgang fielen keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe auf. Jedoch wurde in einem konzentrationsabhängigen, zweiten Versuchsteil, in dem vesikelfreie Spermienproben mit einer unterschiedlichen Vesikelmenge nach dem Auftauen versetzt wurden, eine Wechselwirkung zwischen Vesikelkonzentration und Zeit deutlich. Spermienproben niedriger, vesikulärer Konzentration (0,05 mg Vesikelprotein/ml) wiesen zum Zeitpunkt 0 und insbesondere 10 Minuten nach dem Auftauvorgang eine höhere progressive Motilität (subjektive und objektive Vorwärtsbeweglichkeit; $p=0,0176$ bzw. $p=0,0072$) auf als die Versuchsgruppen höherer Vesikelkonzentration (0,1 mg Vesikelprotein/ml bzw. 0,2 mg Vesikelprotein/ml). Dagegen lagen die Mittelwerte des subjektiv und objektiv geschätzten Anteils der Vorwärtsbeweglichkeit in den Spermienproben 30 Minuten nach dem Auftauvorgang in Gruppe 3 (0,2 mg Vesikelprotein/ml) deutlich höher als diejenigen der anderen Gruppen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass wichtige Erkenntnisse zur grundlegenden, vesikulären Struktur, dem vesikulären Ursprung und erste Hinweise auf einen positiven, vesikulären Einfluss auf die Spermienzellen bzw. genauer deren Bewegungsmuster gewonnen wurden. Wichtige Informationen, vor allem bezüglich einer möglichen Spermien-Vesikel-Interaktion und deren Bedeutung in der caninen Reproduktionsphysiologie, fehlen jedoch bislang. Daher sollten sich zur Erforschung der offenen Fragen weitere Untersuchungen anschließen, um die gewonnenen Daten zu ergänzen.

7 Summary

Identification and characterization of vesicular structures in the canine ejaculate and study on the vesicular function

Vesicular structures in the ejaculate of many species, e. g. man, bull, horse and boar, have been subject of research for a long time. Until now, only little information about these vesicles in canine semen is available. Whereas multiple functions of human vesicles within the scope of sperm physiology are well-known, the state of knowledge with regard to the situation in dogs leaves many open questions. This background led to the present study in order to gain new insights into the canine vesicular structure und the vesicular function, especially with a view to the use of vesicles as sperm-promoting agents in cryopreservation of canine semen.

Ejaculates of 35 dogs were selected (31 normospermic, 2 hypokinozoospermic dogs, 1 dog with pathospermia and 1 castrated azoospermic dog)) and investigated by means of light (LM) (n=35) and electron microscopy (EM) (n=18), SDS-PAGE (n=14), MALDI-TOF-analysis (n=6), HPTLC followed by iod staining and densitometry (for determination of phosholipids, PL) (n=14), and cholesterol assay (n=12). In order to examine the vesicular effect on sperm motility, semen of 10 healthy dogs was frozen with and without vesicles or vesicles were added after thawing. Semen evaluation after thawing was performed by means of CASA and LM, including HOS-Test, Spermac®-staining (evaluation of morphology) and Eosin-staining (proportion of living/dead spermatozoa) at 0, 10 and 30 minutes after thawing. In a second approach vesicles were added to the semen samples after thawing resulting in three groups of increasing vesicle concentrations (0,05, 0,1 and 0,2 mg protein/ml). Semen evaluation was performed by CASA and LM at 0, 10 and 30 minutes after thawing.

Vesicular particles were detected by means of light microscopy in samples of all 35 dogs, independent of their status of fertility. 11 types of vesicles, which were grouped based on morphological properties and detected both in fertile and infertile dogs, could be identified using electron microscopy. Differences between fertile and infertile dogs were evident comparing the maximal vesicle size (normospermia: mean: 195 nm; range: 25–3289 nm, n=15; hypokinozoospermia: mean: 196 nm; range: 21–2096 nm, n=2; azoospermia: mean: 204 nm; range: 22–1314 nm, n=1) and the distribution pattern of types of vesicles. It has to be clarified, if there are vesicle-type-specific functions and if there is a relationship between

vesicle type distribution patterns and fertility. Although it is unclear, if the vesicles are a mixture of different genital gland secretions, the sample of a castrated male, whose ejaculate presented vesicles, demonstrated a prostatic origin of at least a part of the seminal particles. SDS-PAGE and HPTLC showed a complex protein and lipid pattern of the vesicles. SDS-PAGE revealed distinct bands at about 17 and 40 kDa, in contrast to prominent bands at <15 kDa and 25 kDa in semen samples. MALDI-TOF identified the proteins actin and S100A9. Regarding lipids, cholesterol, phosphatidylethanolamine, sphingomyeline und phosphatidylcholine were isolated and their contents were measured ($\bar{x}_{geom} \times SF^{\pm 1}$: 0,078 x 3,02 ± 1 μg cholesterol/ μg vesicle protein, range: 0,009–0,244 μg cholesterol/ μg vesicle protein, n=11; 0,200 x 1,83 ± 1 μg phosphatidylethanolamine / μg vesicle protein, range: 0,060–0,500 μg phosphatidylethanolamine/ μg vesicle protein, n=14; 0,076 x 1,73 ± 1 μg sphingomyeline/ μg vesicle protein, range: 0,021–0,200 μg Sphingomyelin/ μg Vesikelprotein, n=14; 0,052 x 2,17 ± 1 μg phosphatidylcholine / μg vesicle protein, range: 0,009–0,160 μg phosphatidylcholine/ μg vesicle protein, n=14). In contrast to vesicles of other species, where sphingomyeline is the main phospholipid, phosphatidylethanolamine was the quantitatively predominant one of the measured phospholipids in canine vesicles. Further qualitative and quantitative research on other vesicular lipid components would be important to test for the role of the individual structures.

Moreover, semen was frozen with and without vesicles or vesicles were added after thawing. The results on the effect of vesicles on frozen-thawed canine semen were contradictory: Semen evaluation after thawing using CASA and LM resulted in significant differences for CASA motility parameters DAP ($p=0,0107$), DCL ($p=0,0456$), DSL ($p=0,022$), VAP ($p=0,0053$), VCL ($p=0,0375$) und VSL ($p=0,0112$). Semen frozen with vesicles showed higher values compared to semen without vesicles or semen with vesicles added after thawing. At the same time this group revealed significantly higher proportions of immotile ($p=0,0555$) and dead ($p=0,0005$) sperm. Possible reasons for these contradictory findings on vesicular influence on sperm cells could be methodically based artefacts (use of silica medium for density gradient centrifugation; low vesicular concentration). Addition of vesicles to vesicle-free semen samples after thawing resulted in similar values in comparison to the vesicle-free control group. In the second part of this experiment vesicle-free semen samples were spiked with different increasing amounts of vesicles and a significant interaction between vesicle concentration and time was identified. Whereas semen samples

with low vesicle concentration (0,05 mg vesicle protein/ml) at 0 and especially at 10 minutes after thawing showed a higher proportion of progressive motile sperm cells (subjective and objective parameters; $p=0,0176$ bzw. $p=0,0072$) than the study groups with higher vesicular concentrations (0,1 mg vesicle protein /ml bzw. 0,2 mg vesicle protein /ml), the samples containing 0,2 mg vesicle protein/ml revealed the highest proportion of progressive motile sperm cells at 30 minutes after thawing compared to the other groups.

In conclusion, this study reveals important facts concerning the vesicular structure and origin, including first hints on a promotive, vesicular effect on sperm motility in the dog. However, details of the canine vesicle-sperm-interaction and its meaning in the reproduction physiology are still unclear and require further investigation.

8 Literaturverzeichnis

Aalberts, M. (2010): MiRNA containing exosomes in seminal plasma. In: Gordon Research Conferences 19: Reproductive Tract Biology; Proctor Academy Andover, New Hampshire, USA, 15.08.2010

Aalberts, M.; van Dissel-Emiliani, F.; van Adrichem, N.; van Wijnen, M.; Wauben, M.; Stout, T.; Stoorvogel, W. (2012): Identification of distinct populations of prostasomes that differentially express prostate stem cell antigen, annexin A1, and GLIPR2 in humans. In: Biol. Reprod. 86 (3): 82, S. 1-8

Aalberts, M.; Sostaric, E.; Wubbolts, R.; Wauben, M. W. M.; Nolte-'t Hoen, E.; Gadella, B. M. (2013): Spermatozoa recruit prostasomes in response to capacitation induction. In: Biochim. Biophys. Acta 1834 (11), S. 2326–2335

Aalberts, M.; Stout, T.; Stoorvogel, W. (2014): Prostasomes: Extracellular vesicles from the prostate. In: Reprod. 147 (1), S. R1-14

Agrawal, Y.; Vanha-Perttula, T. (1986): Dipeptidyl peptidases in bovine reproductive organs and secretions. In: Int. J. Androl. 9 (6), S. 435–452

Agrawal, Y. Vanha-Perttula T. (1987): Effect of secretory particles in bovine seminal vesicle secretion motility and reaction secretion on sperm motility and acrosome reaction secretory particles. In: J. Reprod. Fertil. 79 (2), S. 409–419

Aitken, R. J. (2000): Possible redox regulation of sperm motility activation. In: J. Androl. 21 (4), S. 491–496

Allegrucci, C.; Ronquist, G.; Ove Nilsson, B.; Carlsson, L.; Lundqvist, M.; Minelli, A.; Larsson, A. (2001a): Circulating human antisperm antibodies recognize prostasomes. In: Am. J. Reprod. Immunol. 46 (3), S. 211–219

Allegrucci, C.; Liguori, L.; Minelli, A. (2001b): Stimulation by n6-cyclopentyladenosine of A1 adenosine receptors, coupled to galphai2 protein subunit, has a capacitative effect on human spermatozoa. In: Biol. Reprod. 64 (6), S. 1653–1659

Andersson, E.; Sørensen, O. E.; Frohm, B.; Borregaard, N.; Egesten, A.; Malm, J. (2002): Isolation of human cationic antimicrobial protein-18 from seminal plasma and its association with prostasomes. In: Hum. Reprod. 17 (10), S. 2529–2534

Arienti, G.; Carlini, E.; Palmerini, C. A. (1997a): Fusion of human sperm to prostasomes at acidic pH. In: J. Membr. Biol. 155 (1), S. 89–94

Arienti, G.; Carlini, E.; Verdacchi, R.; Cosmi, E. V.; Palmerini, C. A. (1997b): Prostate to sperm transfer of CD13/aminopeptidase N (EC 3.4.11.2). In: Biochim. Biophys. Acta 1336 (3), S. 533–538

Arienti, G.; Carlini, E.; Verdacchi, R.; Palmerini, C. A. (1997c): Transfer of aminopeptidase activity from prostasomes to sperm. In: Biochim. Biophys. Acta 1336 (2), S. 269–274

- Arienti, G.; Polci, A.; Carlini, E.; Palmerini, C. A. (1997d): Transfer of CD26/dipeptidyl peptidase IV (E.C. 3.5.4.4) from prostasomes to sperm. In: *Febs Lett.* 410 (2-3), S. 343–346
- Arienti, G.; Carlini, E.; Cosmo, A. M. de; Di Profio, P.; Palmerini, C. A. (1998a): Prostate-like particles in stallion semen. In: *Biol. Reprod.* 59 (2), S. 309–313
- Arienti, G.; Carlini, E.; Saccardi, C.; Palmerini, C. A. (1998b): Interactions between prostasomes and leukocytes. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1425 (1), S. 36–40
- Arienti, G.; Carlini, E.; Polci, A.; Cosmi, E. V.; Palmerini, C. A. (1998c): Fatty acid pattern of human prostatic lipid. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 358 (2), S. 391–395
- Arienti, G.; Carlini, E.; Nicolucci, A.; Cosmi, E. V.; Santi, F.; Palmerini, C. A. (1999a): The motility of human spermatozoa as influenced by prostasomes at various pH levels. In: *Biol. Cell.* 91 (1), S. 51–54
- Arienti, G.; Saccardi, C.; Carlini, E.; Verdacchi, R.; Palmerini, C. A. (1999b): Distribution of lipid and protein in human semen fractions. In: *Clin. Chim. Acta* 289 (1-2), S. 111–120
- Arienti, G.; Nicolucci, A.; Santi, F.; Carlini, E.; Palmerini, C. A. (2001): Progesterone-induced increase of sperm cytosolic calcium is enhanced by previous fusion of spermatozoa to prostasomes. In: *Cell. Calc.* 30 (3), S. 222–227
- Arienti, G.; Carlini, E.; Saccardi, C.; Palmerini, C. (2002): Nitric oxide and fusion with prostasomes increase cytosolic calcium in progesterone-stimulated sperm. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 402 (2), S. 255–258
- Armstrong, J.; Bivalacqua, T.; Chamulitrat, W.; Sikka, S.; Hellstrom, W. (2002): A comparison of the NADPH oxidase in human sperm and white blood cells. In: *Int. J. Androl.* 25 (4), S. 223–229
- Arvidson, G.; Ronquist, G.; Wikander, G.; Ojteg, A. C. (1989): Human prostatic membranes exhibit very high cholesterol/phospholipid ratios yielding high molecular ordering. In: *Biochim. Biophys. Acta* 984 (2), S. 167–173
- Aumüller, G.; Renneberg, H.; Schiemann, P. J.; Wilhelm, B.; Seitz, J.; Konrad, L.; Wennemuth, G. (1997): The role of apocrine released proteins in the post-testicular regulation of human sperm function. In: *Adv. Exp. Med. Biol.* 424, S. 193–219
- Aurich, J. E.; Kühne, A.; Hoppe, H.; Aurich, C. (1996): Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. In: *Theriogenology* 46 (5), S. 791–797
- Babiker, A. A.; Ronquist, G.; Nilsson, U. R.; Nilsson, B. (2002): Transfer of prostatic CD59 to CD59-deficient red blood cells results in protection against complement-mediated hemolysis. In: *Am. J. Reprod. Immunol.* 47 (3), S. 183–192
- Babiker, A. (2005): Prostatic Modulation of Blood Cascade System and Phosphoprotein Reactions with Focus on Prostate Cancer. In: Uppsala: *Acta Univers. Ups.* (Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine, 34)

- Babiker, A.; Ronquist, G.; Nilsson, B.; Ekdahl, K. (2006): Overexpression of ecto-protein kinases in prostasomes of metastatic cell origin. In: *Prostate* 66 (7), S. 675–686
- Babiker, A.; Hamad, O.; Sanchez, J.; Ronquist, G.; Nilsson, B.; Ekdahl, K. (2007): Prothrombotic effect of prostasomes of metastatic cell and seminal origin. In: *Prostate* 67 (4), S. 378–388
- Bartel, D. (2004): MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. In: *Cell* 116 (2), S. 281–297
- Bartlett, G. R. (1959): Phosphorus assay in column chromatography. In: *J. Biol. Chem.* 234 (3), S. 466–468
- Bartlett, D. J. (1962): Studies on Dog Semen. In: *Reprod.* 3 (2), S. 173–189
- Bechoua, S.; Rieu, I.; Sion, B.; Grizard, G. (2011): Prostasomes as potential modulators of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa. In: *Syst. Biol. Reprod. Med.* 57 (3), S. 139–148
- Belleannee, C.; Calvo, E.; Caballero, J.; Sullivan, R. (2013a): Epididymosomes convey different repertoires of microRNAs throughout the bovine epididymis. In: *Biol. Reprod.* 89 (2): 30, S. 1–11
- Belleannee, C.; Legare, C.; Calvo, E.; Thimon, V.; Sullivan, R. (2013b): MicroRNA signature is altered in both human epididymis and seminal microvesicles following vasectomy. In: *Hum. Reprod.* 28 (6), S. 1455–1467
- Bellezza, I.; Aisa, M. C.; Palazzo, R.; Costanzi, E.; Mearini, E.; Minelli, A. (2005): Extracellular matrix degrading enzymes at the prostatic surface. In: *Prostate Cancer P. D.* 8 (4), S. 344–348
- Blendinger, K. (2007): Collection and evaluation of the semen in the dog. In: *Proceedings of the SCIVAC Congress: 56° Congresso Internazionale Multisala SCIVAC, Rimini, Italien, 1.-3.06.2007*
- Bloom, G.; Nicander, L. (1961): On the ultrastructure and development of the protoplasmic droplet of spermatozoa. In: *Z. Zellforsch. Mikros. Anat.* 55 (6), S. 833–844
- Bordi, F.; Cametti, C.; Luca, F. de; Carlini, E.; Palmerini, C. A.; Arienti, G. (2001): Hydrodynamic radii and lipid transfer in prostatic self-fusion. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 396, S. 10–15
- Boussac, M.; Garin, J. (2000): Calcium-dependent secretion in human neutrophils: a proteomic approach. In: *Electrophoresis* 21 (3), S. 665–672
- Bray, C.; Son, J-H; Meizel, S. (2005): Acetylcholine causes an increase of intracellular calcium in human sperm. In: *Mol. Hum. Reprod.* 11 (12), S. 881–889
- Breitbart, H.; Rubinstein, S. (1982): Characterization of Mg²⁺- and Ca²⁺-ATPase activity in membrane vesicles from ejaculated ram seminal plasma. In: *Arch. Androl.* 9 (2), S. 147–157

- Brody, I.; Ronquist, G.; Gottfries, A.; Stegmayr, B. (1981): Abnormal deficiency of both Mg-2+-dependent and Ca-2+-dependent adenosine-triphosphatase and secretory granules and vesicles in human seminal plasma. In: *Scand. J. Urol. Nephrol.* 15 (2), S. 85–90
- Brody, I.; Ronquist, G.; Gottfries, A. (1983): Ultrastructural localization of the prostasome - an organelle in human seminal plasma. In: *Ups. J. Med. Sci.* 88 (2), S. 63–80
- Broekhuijse, M. L. W. J.; Šoštarić, E.; Feitsma, H.; Gadella, B. M. (2011): Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. In: *Theriogenology* 76 (8), S. 1473–1486
- Brouwers, J. F.; Aalberts, M.; Jansen, J. W. A.; van Niel, G.; Wauben, M.; Stout, T. et al. (2013): Distinct lipid compositions of two types of human prostasomes. In: *Proteomics* 13 (10-11), S. 1660–1666
- Bucak, M. N.; Ataman, M. B.; Baspinar, N.; Uysal, O.; Taspinar, M.; Bilgili, A. et al. (2014): Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. In: *Andrologia* 47 (5), S. 545-552
- Burgess, C. M.; Bredl, J. C.; Plummer, J. M.; England, G. C. (2001): Vital and ultrastructural changes in dog spermatozoa during cryopreservation. In: *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 57, S. 357–363
- Burgess, C. M.; Clutterbuck, A. L.; England, G C W (2012): The effect of cryopreservation on the capacitation status and epithelial cell attachment capability of dog spermatozoa. In: *Vet. J.* 192 (3), S. 398–402
- Caballero, J.; Frenette, G.; D'Amours, O.; Dufour, M.; Oko, R.; Sullivan, R. (2012): ATP-binding cassette transporter G2 activity in the bovine spermatozoa is modulated along the epididymal duct and at ejaculation. In: *Biol. Reprod.* 86 (6), 181, S. 1-11
- Caballero, J. N.; Frenette, G.; Belleannee, C.; Sullivan, R. (2013): CD9-Positive Microvesicles Mediate the Transfer of Molecules to Bovine Spermatozoa during Epididymal Maturation. In: *PLoS One* 8 (6), e65364, S. 1-12
- Carlini, E.; Palmerini, C. A.; Cosmi, E. V.; Arienti, G. (1997): Fusion of sperm with prostasomes: effects on membrane fluidity. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 343 (1), S. 6–12
- Carlsson, L.; Ronquist, G.; Stridsberg, M.; Johansson, L. (1997): Motility stimulant effects of prostasome inclusion in swim-up medium on cryopreserved human spermatozoa. In: *Arch. Androl.* 38 (3), S. 215–221
- Carlsson, L.; Pålsson, C.; Bergquist, M.; Ronquist, G.; Stridsberg, M. (2000a): Antibacterial activity of human prostasomes. In: *Prostate* 44 (4), S. 279–286
- Carlsson, L.; Lennartsson, L.; Nilsson, B. O.; Nilsson, S.; Ronquist, G. (2000b): Growth-inhibitory effect of prostasomes on prostatic cancer cell lines in culture. In: *Eur. Urol.* 38 (4), S. 468–474

- Carlsson, L.; Ronquist, G.; Nilsson, B. O.; Larsson, A. (2004a): Dominant prostasome immunogens for sperm-agglutinating autoantibodies of infertile men. In: *J. Androl.* 25 (5), S. 699–705
- Carlsson, L.; Nilsson, B. O.; Ronquist, G.; Lundquist, M.; Larsson, A. (2004b): A new test for immunological infertility: an ELISA based on prostasomes. In: *Int. J. Androl.* 27 (3), S. 130–133
- Carlsson, L.; Larsson, A.; Ronquist, G.; Nilsson, B. O. (2004c): Prostate antigens as targets for sperm agglutinating antibodies demonstrated by 1-D gel electrophoresis and immunoblotting. In: *Int. J. Androl.* 27 (6), S. 360–367
- Castellini, C.; Cardinali, R.; Dal Bosco, A.; Minelli, A.; Camici, O. (2006): Lipid composition of the main fractions of rabbit semen. In: *Theriogenology* 65 (4), S. 703–712
- Castellini, C.; Mourvaki, E.; Cardinali, R.; Collodel, G.; Lasagna, E.; Del Vecchio, M. T.; Dal Bosco, A. (2012): Secretion patterns and effect of prostate-derived granules on the sperm acrosome reaction of rabbit buck. In: *Theriogenology* 78 (4), S. 715–723
- Castellini, C.; Mattioli, S.; Ruggeri, S.; Dal Bosco, A.; Collodel, G. (2013): The time-dependent effects of prostate granules and seminal plasma on the capacitation, acrosome reaction, and motility of rabbit sperm. In: *Anim. Reprod. Sci.* 140 (1-2), S. 97–102
- Chan, P. J.; Su, B. C.; Tredway, D. R. (1991): Diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) and triphosphate (Ap₃A) signaling of human sperm motility. In: *Arch. Androl.* 27 (2), S. 103–108
- Chomsimek, N.; Choktanasiri, W.; Wongkularb, A.; O-Prasertsawat, P. (2008): Effect of Time between Ejaculation and Analysis on Sperm Motility. In: *Thai J. Obstet. Gynec.* (16), S. 109–114
- Christiansen, I. J. (Hg.) (1984): *Reproduction in the Dog and Cat. Reproduction in the Dog: Chapter 4: Andrology of the normal male.* Baillière Tindall, London, Philadelphia
- Ciruela, F.; Saura, C.; Canela, E. I.; Mallol, J.; Lluís, C.; Franco, R. (1996): Adenosine deaminase affects ligand-induced signalling by interacting with cell surface adenosine receptors. In: *FEBS Lett.* 380 (3), S. 219–223
- Collodel, G.; Cardinali, R.; Moretti, E.; Mattioli, S.; Ruggeri, S.; Castellini, C. (2012): Role of rabbit prostate granules on sperm viability and acrosome reaction evaluated with different methods. In: *Theriogenology* 77 (5), S. 1021–1026
- Cooper, T. (2011): The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. In: *Asian J. Androl.* 13 (1), S. 130–138
- Costanzo, R.; Paoli, T. de; Ihlo, J. E.; Hager, A. A.; Farach, H. A.; Poole Jr, C. P.; Knight, J. M. (1994): ESR study of order and dynamics in lecithin liposomes with high cholesterol content. In: *Spectrochim. Acta A* 50 (2), S. 203–208

- Croce, K.; Gao, H.; Wang, Y.; Mooroka, T.; Sakuma, M.; Shi, C. et al. (2009): Myeloid-related protein-8/14 is critical for the biological response to vascular injury. In: *Circulation* 120 (5), S. 427–436
- Cross, N. L. (1994): Phosphatidylcholine enhances the acrosomal responsiveness of human sperm. In: *J. Androl.* 15 (5), S. 484–488
- Cross, N. L. (1998): Role of cholesterol in sperm capacitation. In: *Biol. Reprod.* 59 (1), S. 7–11
- Cross, N. L. (2000): Sphingomyelin modulates capacitation of human sperm in vitro. In: *Biol. Reprod.* 63 (4), S. 1129–1134
- Cross, N. L. (2003): Decrease in order of human sperm lipids during capacitation. In: *Biol. Reprod.* 69 (2), S. 529–534
- Dahlbom, M.; Andersson, M.; Vierula, M.; Alanko, M. (1997): Morphometry of normal and teratozoospermic canine sperm heads using an image analyzer: work in progress. In: *Theriogenology* 48 (4), S. 687–698
- D'Amours, O.; Frenette, G.; Bordeleau, L.; Allard, N.; Leclerc, P.; Blondin, P.; Sullivan, R. (2012): Epididymosomes transfer epididymal sperm binding protein 1 (ELSPBP1) to dead spermatozoa during epididymal transit in bovine. In: *Biol. Reprod.* 87 (4): 94, S. 1–11
- Darszon, A.; Lopez-Martinez, P.; Acevedo, J.; Hernandez-Cruz, A.; Trevino, C. (2006): T-type Ca^{2+} channels in sperm function. In: *Cell. Calcium* 40 (2), S. 241–252
- Davis, B. K. (1973): Occurrence of vesicles in rabbit seminal plasma. In: *Experientia* 29 (12), S. 1484–1487
- Davis, B. K. (1974): Decapacitation and recapacitation of rabbit spermatozoa treated with membrane vesicles from seminal plasma. In: *Reprod.* 41 (1), S. 241–244
- Davis, B. K.; Hungrund, B. J. (1976): Effect of modified membrane vesicles from seminal plasma on the fertilizing capacity of rabbit spermatozoa. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69 (4), S. 1004–1010
- Dominguez, L.; Yunes, R. M.; Fornes, M. W.; Burgos, M.; Mayorga, L. S. (1999): Calcium and phospholipase A2 are both required for the acrosome reaction mediated by G-proteins stimulation in human spermatozoa. In: *Mol. Reprod. Dev.* 52 (3), S. 297–302
- Domon, B.; Aebersold, R. (2006): Mass spectrometry and protein analysis. In: *Science* 312 (5771), S. 212–217
- Dorado, J.; Alcaraz, L.; Duarte, N.; Portero, J. M.; Acha, D.; Demyda, S. et al. (2011a): Centrifugation on PureSperm® density-gradient improved quality of spermatozoa from frozen-thawed dog semen. In: *Theriogenology* 76 (2), S. 381–385
- Dorado, J.; Alcaraz, L.; Duarte, N.; Portero, J. M.; Acha, D.; Hidalgo, M. (2011b): Changes in the structures of motile sperm subpopulations in dog spermatozoa after both cryopreservation and centrifugation on PureSperm® gradient. In: *Anim. Reprod. Sci.* 125 (1–4), S. 211–218

- Dorado, J.; Rijsselaere, T.; Munoz-Serrano, A.; Hidalgo, M. (2011c): Influence of sampling factors on canine sperm motility parameters measured by the Sperm Class Analyzer. In: Syst Biol. Reprod. Med 57 (6), S. 318–325
- Dorado, J.; Alcaraz, L.; Galvez, M. J.; Acha, D.; Ortiz, I.; Urbano, M.; Hidalgo, M. (2013): Single-layer centrifugation through PureSperm® 80 selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed dog semen. In: Anim. Reprod. Sci. 140 (3-4), S. 232–240
- Ecroyd, H.; Sarradin, P.; Dacheux, J.; Gatti, J. (2004): Compartmentalization of prion isoforms within the reproductive tract of the ram. In: Biol. Reprod. 71 (3), S. 993–1001
- Eisenberg, I.; Barash, M.; Kahan, T.; Mitrani-Rosenbaum, S. (2002): Cloning and characterization of a human novel gene C9orf19 encoding a conserved putative protein with an SCP-like extracellular protein domain. In: Gene 293 (1-2), S. 141–148
- Eitzen, G. (2003): Actin remodeling to facilitate membrane fusion. In: Membrane Fus. 1641 (2–3), S. 175–181
- Ek, P.; Malm, J.; Lilja, H.; Carlsson, L.; Ronquist, G. (2002): Exogenous protein kinases A and C, but not endogenous prostasome-associated protein kinase, phosphorylate semenogelins I and II from human semen. In: J. Androl. 23 (6), S. 806–814
- Ekdahl, K.; Ronquist, G.; Nilsson, B.; Babiker, A. (2006): Possible immunoprotective and angiogenesis-promoting roles for malignant cell-derived prostasomes: a new paradigm for prostatic cancer? In: Adv. Exp. Med. Biol. 586, S. 107–119
- El-Hajj Ghaoui, R.; Thomson, P. C.; Evans, G.; Maxwell, W. M. C. (2006): The origin of membrane vesicles in ram seminal plasma. In: Reprod. Domest. Anim. 41 (2), S. 98–105
- Ellington, J.; Scarlett, J.; Meyers-Wallen, V.; Mohammed, H. O.; Surman, V. (1993): Computer-assisted sperm analysis of canine spermatozoa motility measurements. In: Theriogenology 40 (4), S. 725–733
- El-Rifai, W.; Moskaluk, C.; Abdrabbo, M.; Harper, Jeffery; Y., Cynthia; R., Gregory J. et al. (2002): Gastric cancers overexpress S100A calcium-binding proteins. In: Cancer Res. 62 (23), S. 6823–6826
- Elzanaty, S.; Malm, J. (2007): Effects of ejaculation-to-analysis delay on levels of markers of epididymal and accessory sex gland functions and sperm motility. In: J. Androl. 28 (6), S. 847–852
- England, G. C. W.; Allen, W. E. (1992): Factors affecting the viability of canine spermatozoa: II. Effects of seminal plasma and blood. In: Theriogenology 37 (2), S. 373–381
- England, G. C. (1993): Cryopreservation of dog semen: a review. In: J. Reprod. Fertil. Suppl. 47, S. 243–255
- Evans, J.; Florman, H. (2002): The state of the union: the cell biology of fertilization. In: Nat. Cell. Biol. Fert. Suppl. 4, S. 57–63

- Fabiani, R.; Ronquist, G. (1993): Characteristics of membrane-bound 5'-nucleotidase on human prostasomes. In: *Clin. Chim. Acta* 216 (1-2), S. 175–182
- Fabiani, R.; Johansson, L.; Lundkvist, O.; Ronquist, G. (1994a): Enhanced recruitment of motile spermatozoa by prostatic inclusion in swim-up medium. In: *Hum. Reprod.* 9 (8), S. 1485–1489
- Fabiani, R.; Johansson, L.; Lundkvist, O.; Ulmsten, U.; Ronquist, G. (1994b): Promotive effect by prostasomes on normal human spermatozoa exhibiting no forward motility due to buffer washings. In: *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 57 (3), S. 181–188
- Fabiani R, Johansson L. Lundkvist O. Ronquist G. (1995a): Prolongation and improvement of prostatic sperm forward motility. In: *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* (58), S. 191–198
- Fabiani, R.; Ronquist, G. (1995b): Association of some hydrolytic enzymes with the prostatic membrane and their differential responses to detergent and PIPLC treatment. In: *Prostate* 27 (2), S. 95–101
- Fanjul, M.; Renaud, W.; Merten, M.; Guy-Crotte, O.; Hollande, E.; Figarella, C. (1995): Presence of MRP8 and MRP14 in pancreatic cell lines: differential expression and localization in CFPAC-1 cells. In: *Am. J. Physiol.* 268 (5 Pt 1), S. C1241-51
- Fernandez, J. A.; Heeb, M. J.; Radtke, K. P.; Griffin, J. H. (1997): Potent blood coagulant activity of human semen due to prostatic-bound tissue factor. In: *Biol. Reprod.* 56, S. 757–763
- Fernandez, D.; Valdivia, A.; Irazusta, J.; Ochoa, C.; Casis, L. (2002): Peptidase activities in human semen. In: *Peptides* 23 (3), S. 461–468
- Foell, D.; Frosch, M.; Sorg, C.; Roth, J. (2004): Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation. In: *Clin. Chim. Acta* 344 (1-2), S. 37–51
- Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G. H. (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. In: *J. Biol. Chem.* 226 (1), S. 497–509
- Ford, W. (2004): Regulation of sperm function by reactive oxygen species. In: *Hum. Reprod. Update* 10 (5), S. 387–399
- Foresta, C.; Rossato, M.; Di Virgilio, F. (1992): Extracellular ATP is a trigger for the acrosome reaction in human spermatozoa. In: *J. Biol. Chem.* 267 (27), S. 19443–19447
- Fornes, M. W.; Barbieri, A.; Sosa, M. A.; Bertini, F. (1991): First observations on enzymatic activity and protein content of vesicles separated from rat epididymal fluid. In: *Andrologia* 23 (5), S. 347–351
- Fornes, W. M.; Sosa, M. A.; Bertini, F.; Burgos, M. H. (1995): Vesicles in rat epididymal fluid - existence of 2 populations differ in ultrastructure and enzymatic composition. Vesicles in

rat epididymal fluid - existence of 2 populations differin in ultrastructure and enzymatic composition. In: *Andrologia* 27 (4), S. 233–237

Frenette, G.; Dubé, J. Y.; Marcotte, J. R.; Tremblay, R. R. (1985): Arginine esterase from isolated dog prostate secretory granules is fully active enzymatically. In: *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 63 (12), S. 1603–1607

Frenette, G.; Dubé, J. Y.; Tremblay, R. R. (1986): Origin of alkaline phosphatase of canine seminal plasma. In: *Arch. Androl.* 16 (3), S. 235–241

Frenette, G.; Sullivan, R. (2001): Protasome-like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface. In: *Mol. Reprod. Dev.* 59 (1), S. 115–121

Frenette, G.; Lessard, C.; Sullivan, R. (2002): Selected proteins of "protasome-like particles" from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal caput spermatozoa in bull. In: *Biol. Reprod.* 67 (1), S. 308–313

Frenette, G.; Lessard, C.; Madore, E.; Fortier, M. A.; Sullivan, R. (2003): Aldose reductase and macrophage migration inhibitory factor are associated with epididymosomes and spermatozoa in the bovine epididymis. In: *Biol. Reprod.* 69 (5), S. 1586–1592

Frenette, G.; Legare, C.; Saez, F.; Sullivan, R. (2005): Macrophage migration inhibitory factor in the human epididymis and semen. In: *Mol. Hum. Reprod.* 11 (8), S. 575–582

Frenette, G.; Thabet, M.; Sullivan, R. (2006): Polyol pathway in human epididymis and semen. In: *J. Androl.* 27 (2), S. 233–239

Frenette, G.; Girouard, J.; D'Amours, O.; Allard, N.; Tessier, L.; Sullivan, R. (2010): Characterization of Two Distinct Populations of Epididymosomes Collected in the Intraluminal Compartment of the Bovine Cauda Epididymis. In: *Biol. Reprod.* 83 (3), S. 473–480

Freshman, J. (2002): Semen collection and evaluation. In: *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 17 (3), S. 104–107

Gao, D. Y.; Ashworth, E.; Watson, P. F.; Kleinhans, F. W.; Mazur, P.; Critser, J. K. (1993): Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. In: *Biol. Reprod.* 49 (1), S. 112–123

Gatti, J-L; Castella, S.; Dacheux, F.; Ecroyd, H.; Metayer, S.; Thimon, V.; Dacheux, J-L (2004): Post-testicular sperm environment and fertility. In: *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, S. 321–339

Gatti, J. L.; Metayer, S.; Belghazi, M.; Dacheux, F.; Dacheux, J. L. (2005): Identification, proteomic profiling, and origin of ram epididymal fluid exosome-like vesicles. In: *Biol. Reprod.* 72, S. 1452–1465

Gennaro, L. A.; Fried, B.; Sherma, J. (1996): HPTLC Determination of phospholipids in snail-conditioned water from *Helisoma-trivolvis* and *Biomphalaria-glabrata*. In: *JPC-J. Planar Chromat.* 9 (5), S. 379–381

- Gerke, V.; Creutz, C.; Moss, S. (2005): Annexins: linking Ca^{2+} signalling to membrane dynamics. In: *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6 (6), S. 449–461
- Ghaoui, R.; Thomson, P. C.; Evans, G.; Maxwell, W. M. C. (2004): Characterization and localization of membrane vesicles in ejaculate fractions from the ram, boar and stallion. In: *Reprod. Domest. Anim.* 39 (3), S. 173–180
- Ghaoui, R.; Gillan, L.; Thomson, P.; Evans, G.; Maxwell, W. M. C. (2007): Effect of seminal plasma fractions from entire and vasectomized rams on the motility characteristics, membrane status, and in vitro fertility of ram spermatozoa. In: *J. Androl.* 28 (1), S. 109–122
- Girasole, M.; Cricenti, A.; Rindone, C.; Congiu-Castellano, A.; Arienti, G.; Saccardi, C.; Palmerini, C. A. (2003): Prostate self-fusion studied by atomic force microscopy. In: *J. Phys. Chem. B* 107 (35), S. 9585–9588
- Girouard, J.; Frenette, G.; Sullivan, R. (2011): Comparative proteome and lipid profiles of bovine epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the caput and cauda epididymidis. In: *Int. J. Androl.* 34 (5), S. e475-e486
- Girouard, J.; Frenette, G.; Sullivan, R. (2009): Compartmentalization of Proteins in Epididymosomes Coordinates the Association of Epididymal Proteins with the Different Functional Structures of Bovine Spermatozoa1. In: *Biol. Reprod.* 80, S. 965–972
- Goericke-Pesch, S.; Klaus, D.; Failing, K.; Wehrend, A. (2012): Longevity of chilled canine semen comparing different extenders. In: *Anim. Reprod. Sci.* 135 (1-4), S. 97-105
- Goericke-Pesch, S.; Failing, K. (2013): Retrospective analysis of canine semen evaluations with special emphasis on the use of the hypoosmotic swelling (HOS) test and acrosomal evaluation using Spermac®. In: *Reprod. Domest. Anim.* 48 (2), S. 213–217
- Goyal, A.; Delves, G. H.; Chopra, M.; Lwaleed, B. A.; Cooper, A. J. (2006): Can lycopene be delivered into semen via prostasomes? In vitro incorporation and retention studies. In: *Int. J. Androl.* 29 (5), S. 528–533
- Grasa, P.; Cebrián-Pérez, J.; Muiño-Blanco, T. (2006): Signal transduction mechanisms involved in in vitro ram sperm capacitation. In: *Reprod.* 132 (5), S. 721–732
- Green, C. M.; Cockle, S. M.; Watson, P. F.; Fraser, L. R. (1996): A possible mechanism of action for fertilization promoting peptide, a TRH-related tripeptide that promotes capacitation and fertilizing ability in mammalian spermatozoa. In: *Mol. Reprod. Dev.* 45 (2), S. 244–252
- Grellet, A.; Heilmann, R.; Lecoindre, P.; Feugier, A.; Day, M.; Peeters, D. et al. (2013): Fecal calprotectin concentrations in adult dogs with chronic diarrhea. In: *Am. J. Vet. Res.* 74 (5), S. 706–711
- Griffiths, G.; Galileo, D.; Reese, K.; Martin-Deleon, P. (2008): Investigating the role of murine epididymosomes and uterosomes in GPI-linked protein transfer to sperm using SPAM1 as a model. In: *Mol. Reprod. Dev.* 75 (11), S. 1627–1636

- Grizard, G.; Sion, B.; Bauchart, D.; Boucher, D. (2000): Separation and quantification of cholesterol and major phospholipid classes in human semen by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection. In: *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 740 (1), S. 101–107
- Gulaya, N. M.; Margitich, V. M.; Govseeva, N. M.; Klimashevsky, V. M.; Gorpynchenko, I. I.; Boyko, M. I. (2001): Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. In: *Arch. Androl.* 46 (3), S. 169–175
- Günzel-Apel, A.-R., Terhaer, P., Waberski, D. (1994): Hodendimensionen und Ejakulatbeschaffenheit fertiler Rüden unterschiedlicher Körpergewichte. In: *Kleintierpraxis* (39), S. 483–486
- He, L.; Bailey, J. L.; Buhr, M. M. (2001): Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential. In: *Biol. Reprod.* 64 (1), S. 69–79
- Heilmann, R. M.; Suchodolski, J. S.; Steiner, J. M. (2008): Purification and partial characterization of canine calprotectin. In: *Biochim.* 90 (9), S. 1306–1315
- Heilmann, R.; Jergens, A.; Ackermann, M.; Barr, J.; Suchodolski, J.; Steiner, J. (2012): Serum calprotectin concentrations in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. In: *Am. J. Vet. Res.* 73 (12), S. 1900–1907
- Heilmann, R.; Wright, Z.; Lanerie, D.; Suchodolski, J.; Steiner, J. (2014): Measurement of urinary canine S100A8/A9 and S100A12 concentrations as candidate biomarkers of lower urinary tract neoplasia in dogs. In: *J. Vet. Diagn. Invest.* 26 (1), S. 104–112
- Henkel, R.; Schill, W. (2003): Sperm preparation for ART. In: *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1 (108)
- Hermani, A.; Hess, J.; Servi, B. de; Medunjanin, S.; Grobholz, R.; Trojan, L. et al. (2005): Calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 as novel diagnostic markers in human prostate cancer. In: *Clin. Cancer Res.* 11 (14), S. 5146–5152
- Hermansson, U.; Linde Forsberg, C. (2006): Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. In: *Theriogenology* 65 (3), S. 584–593
- Herrero, M.; Lamirande, E. de; Gagnon, C. (2003): Nitric oxide is a signaling molecule in spermatozoa. In: *Curr. Pharm. Des.* 9 (5), S. 419–425
- Hessvik, N.; Phuyal, S.; Brech, A.; Sandvig, K.; Llorente, A. (2012): Profiling of microRNAs in exosomes released from PC-3 prostate cancer cells. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1819 (11-12), S. 1154–1163
- Hirano, Y.; Shibahara, H.; Obara, H.; Suzuki, T.; Takamizawa, S.; Yamaguchi, C. et al. (2001): Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. In: *J. Assist. Reprod. Genet.* 18 (4), S. 213–218
- Hise, M. K.; Mantulin, W. W.; Weinman, E. J. (1986): Fatty acyl chain composition in the determination of renal membrane order. In: *J. Clin. Invest.* 77 (3), S. 768–773

- Ho, H.; Suarez, S. (2001): Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. In: *Reprod.* 122 (4), S. 519–526
- Hoffmann, B. (Hg.) (2003): *Andrologie - Physiologie, Pathologie und Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung*. Lehmanns Media, Berlin, Deutschland
- Holt, W. V.; North, R. D. (1994): Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. In: *Biol. Reprod.* 51 (3), S. 414–424
- Hosseini-Beheshti, E.; Pham, S.; Adomat, H.; Li, N.; Tomlinson, Guns E. S. (2012): Exosomes as biomarker enriched microvesicles: characterization of exosomal proteins derived from a panel of prostate cell lines with distinct AR phenotypes. In: *Mol. Cell. Prot.* 11 (10), S. 863–885
- Ichikawa, M.; Williams, R.; Wang, L.; Vogl, T.; Srikrishna, G. (2011): S100A8/A9 activate key genes and pathways in colon tumor progression. In: *Mol. Cancer Res.* 9 (2), S. 133–148
- Iguer-Ouada, M.; Verstegen, J. P. (2001): Evaluation of the "Hamilton Thorn computer-based automated system" for dog semen analysis. In: *Theriogenology* 55 (3), S. 733–749
- Imaoka, T.; Yamashita, S.; Nishimura, M.; Kakinuma, S.; Ushijima, T.; Shimada, Y. (2008): Gene expression profiling distinguishes between spontaneous and radiation-induced rat mammary carcinomas. In: *J. Radiat. Res.* 49 (4), S. 349–360
- Irazusta, J.; Valdivia, A.; Fernandez, D.; Agirregoitia, E.; Ochoa, C.; Casis, L. (2004): Enkephalin-degrading enzymes in normal and subfertile human semen. In: *J. Androl.* 25 (5), S. 733–739
- Itou, H.; Yao, M.; Fujita, I.; Watanabe, N.; Suzuki, M.; Nishihira, J.; Tanaka, I. (2002): The crystal structure of human MRP14 (S100A9), a Ca²⁺-dependent regulator protein in inflammatory process. In: *J. Mol. Biol.* 316 (2), S. 265–276
- Janvilisri, T.; Venter, H.; Shahi, S.; Reuter, G.; Balakrishnan, L.; van Veen, H. (2003): Sterol transport by the human breast cancer resistance protein (ABCG2) expressed in *Lactococcus lactis*. In: *J. Biol. Chem.* 278 (23), S. 20645–20651
- Jequier, A. M.; Ukombe, E. B. (1983): Errors inherent in the performance of a routine semen analysis. In: *Br. J. Urol.* 55 (4), S. 434–436
- Jeyendran, R. S.; Van der Ven, H. H.; Perez-Pelaez, M.; Crabo, B. G.; Zaneveld, L. J. (1984): Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. In: *J. Reprod. Fertil.* 70 (1), S. 219–228
- Jeyendran, R. S.; Van der Ven, H. H.; Zaneveld, L. J. D. (1992): The Hypoosmotic Swelling Test: An Update. In: *Syst. Biol. Reprod. Med* 29 (2), S. 105–116
- Johnston, S. D. (1991): Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. In: *Vet. Clin. North. Am.: Small Anim. Pract.* 21 (3), S. 545–551

- Jonge, C. de (2006): The Sperm Cell. Production, Maturation, Fertilization, Regeneration. Chapter 6 - Regulation of capacitation. 1. Aufl., Cambridge University Press, Cambridge, England
- Kameoka, J.; Tanaka, T.; Nojima, Y.; Schlossman, S. F.; Morimoto, C. (1993): Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. In: Science 261 (5120), S. 466–469
- Kelly, R. W.; Holland, P.; Skibinski, G.; Harrison, C.; McMillan, L.; Hargreave, T.; James, K. (1991): Extracellular organelles (prostasomes) are immunosuppressive components of human semen. In: Clin. Exp. Immunol. 86 (3), S. 550–556
- Kerkhoff, C.; Nacken, W.; Benedyk, M.; Dagher, M.; Sopalla, C.; Doussiere, J. (2005): The arachidonic acid-binding protein S100A8/A9 promotes NADPH oxidase activation by interaction with p67phox and Rac-2. In: Faseb J. 19 (3), S. 467–469
- Kitamura, M.; Namiki, M.; Matsumiya, K.; Tanaka, K.; Matsumoto, M.; Hara, T. et al. (1995): Membrane cofactor protein (CD46) in seminal plasma is a prostatic-bound form with complement regulatory activity and measles virus neutralizing activity. In: Immunology 84 (4), S. 626–632
- Klaus, D. (2012): Evaluierung verschiedener Verdünner zur Flüssikkonservierung von caninem Sperma. 1. Aufl., Laufersweiler Verlag, Gießen, Deutschland
- Klein, T.; Kirsch, D.; Kaufmann, R.; Riesner, D. (1998): Prion Rods Contain Small Amounts of Two Host Sphingolipids as Revealed by Thin-Layer Chromatography and Mass Spectrometry. In: Biol. Chem. 379 (6), S. 355–366
- Korndörfer, I.; Brueckner, F.; Skerra, A. (2007): The crystal structure of the human (S100A8/S100A9)₂ heterotetramer, calprotectin, illustrates how conformational changes of interacting alpha-helices can determine specific association of two EF-hand proteins. In: J. Mol. Biol. 370 (5), S. 887–898
- Kumi-Diaka, J. (1993): Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. In: Theriogenology 39 (6), S. 1279–1289
- Kurata, A.; Terado, Y.; Schulz, A.; Fujioka, Y.; Franke, F. (2005): Inflammatory cells in the formation of tumor-related sarcoid reactions. In: Hum. Pathol. 36 (5), S. 546–554
- Kustritz, M.; Hess, M. (2007): Effect of administration of prostaglandin F2alpha or presence of an estrous teaser bitch on characteristics of the canine ejaculate. In: Theriogenology 67 (2), S. 255–258
- Kutzler, M. (2005): Semen collection in the dog. In: Theriogenology 64 (3), S. 747–754
- Lamirande, E. de; Lamothe, G.; Villemure, M. (2009): Control of superoxide and nitric oxide formation during human sperm capacitation. In: Free Radical Biol. Med. 46 (10), S. 1420–1427

- Lampiao, F.; Strijdom, H.; Du Plessis, S. S. (2010): Effects of Sperm Processing Techniques Involving Centrifugation on Nitric Oxide, Reactive Oxygen Species Generation and Sperm Function. In: *Open Androl. J.* (2), S. 1–5
- Larsson, A.; Ronquist, G.; Wülfing, C.; Eltze, E.; Bettendorf, O.; Carlsson, L. et al. (2006): Antiprostate antibodies: possible serum markers for prostate cancer metastasizing liability. In: *Urol. Oncol.* 24 (3), S. 195–200
- Laurell, C. B.; Weiber, H.; Ohlsson, K.; Rannevik, G. (1982): A zinc-dependent peptidase in prostatic organelles present in seminal plasma. In: *Clin. Chim. Acta* 126 (2), S. 161–170
- Laursen, S.; Andersen, C.; Hindkjaer, J.; Erb, K. (2003): A clinical study comparing PureSperm and SpermFilter for density gradient separation of human spermatozoa in assisted Reproduction. In: *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 82 (10), S. 929–935
- Légaré, C.; Bérubé, B.; Boué, F.; Lefièvre, L.; Morales, C. R.; El-Alfy, M.; Sullivan, R. (1999): Hamster sperm antigen P26h is a phosphatidylinositol-anchored protein. In: *Mol. Reprod. Dev.* 52 (2), S. 225–233
- Li, C.; Li, S.; Jia, C.; Yang, L.; Song, Z.; Wang, Y. (2012a): Low concentration of S100A8/9 promotes angiogenesis-related activity of vascular endothelial cells: bridges among inflammation, angiogenesis, and tumorigenesis? In: *Mediators Inflamm.* 2012, Art. ID 248574
- Li, H.; Huang, S.; Guo, C.; Guan, H.; Xiong, C. (2012b): Cell-Free Seminal mRNA and MicroRNA Exist in Different Forms. In: *PLoS One* 7 (4), e34566, S. 1-8
- Liebich, H. G. (2004): Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. 4. Aufl., Schattauer Verlag, Stuttgart, Deutschland
- Lim, L.; Pervaiz, S. (2007): Annexin 1: the new face of an old molecule. In: *Faseb J.* 21 (4), S. 968–975
- Lindhahl, M.; Tagesson, C.; Ronquist, G. (1987): Phospholipase A2 activity in prostasomes from human seminal plasma. In: *Urol. Int.* 42 (5), S. 385–389
- Linde-Forsberg, C. (1991): Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. In: *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* 21 (3), S. 467–485
- Linde-Forsberg, C.; Forsberg, M. (1993): Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. In: *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47, S. 313–323
- Linde-Forsberg, C. (Hg.) (2001): Regulations and Recommendations for International Shipment of Chilled and Frozen Canine Semen. International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA.
- Lishko, P.; Botchkina, I.; Kirichok, Y. (2011): Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. In: *Nature* 471 (7338), S. 387–391

- Lu, Q.; Zhang, J.; Allison, R.; Gay, H.; Yang, W.; Bhowmick, N. et al. (2009): Identification of extracellular delta-catenin accumulation for prostate cancer detection. In: *Prostate* 69 (4), S. 411–418
- Malm, J.; Nordahl, E.; Bjartell, A.; Sørensen, O.; Frohm, B.; Dentener, M.; Egesten, A. (2005): Lipopolysaccharide-binding protein is produced in the epididymis and associated with spermatozoa and prostasomes. In: *J. Reprod. Immunol.* 66 (1), S. 33–43
- Malsam, J.; Kreye, S.; Sollner, T. H. (2008): Membrane fusion: SNAREs and regulation. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (18), S. 2814–2832
- Marenholz, I.; Lovering, R.; Heizmann, C. (2006): An update of the S100 nomenclature. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1763 (11), S. 1282–1283
- Marshburn, P. B.; McIntire, D.; Carr, B. R.; Byrd, W. (1992): Spermatozoal characteristics from fresh and frozen donor semen and their correlation with fertility outcome after intrauterine insemination. In: *Fertil. Steril.* 58 (1), S. 179–186
- Martinez, A. (2004): Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. In: *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, S. 209–224
- Martinez-Heredia, J.; Mateo, S. de; Vidal-Taboada, J.; Ballesca, J.; Oliva, R. (2008): Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. In: *Hum. Reprod.* 23 (4), S. 783–791
- Mathivanan, S.; Ji, H.; Simpson, R. (2010): Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. In: *J. Proteomics* 73 (10), S. 1907–1920
- Metz, C. B.; Hinsch, G. W.; Anika, J. L. (1968): Ultrastructure and antigens of particles from rabbit semen. In: *J. Reprod. Fertil.* (17), S. 195–198
- Metz-Boutigue, M. H.; Goumon, Y.; Lugardon, K.; Strub, J. M.; Aunis, D. (1998): Antibacterial peptides are present in chromaffin cell secretory granules. In: *Cell. Mol. Neurobiol.* 18 (2), S. 249–266
- Minelli, A.; Moroni, M.; Martínez, E.; Mezzasoma, I.; Ronquist, G. (1998): Occurrence of prostatesome-like membrane vesicles in equine seminal plasma. In: *J. Reprod. Fertil.* 114 (2), S. 237–243
- Minelli, A.; Allegrucci, C.; Mezzasoma, I.; Ronquist, G.; Lluís, C.; Franco, R. (1999): CD26 and adenosine deaminase interaction: its role in the fusion between horse membrane vesicles and spermatozoa. In: *Biol. Reprod.* 61 (3), S. 802–808
- Minelli, A.; Allegrucci, C.; Piomboni, P.; Mannucci, R.; Lluís, C.; Franco, R. (2000): Immunolocalization of A1 adenosine receptors in mammalian spermatozoa. In: *J. Histochem. Cytochem.* 48 (9), S. 1163–1171
- Minelli, A.; Allegrucci, C.; Liguori, L.; Ronquist, G. (2002): Ecto-diadenosine polyphosphates hydrolase activity on human prostasomes. In: *Prostate* 51 (1), S. 1–9

- Minelli, A.; Liguori, L.; Bellezza, I.; Renieri, T.; Castellini, C. (2003): Effects of diadenosine polyphosphates and seminal fluid vesicles on rabbit sperm cells. In: *Reprod.* 125, S. 827–835
- Minelli, A.; Ronquist, G.; Carlsson, L.; Mearini, E.; Nilsson, O.; Larsson, A. (2005): Antiprososome antibody titres in benign and malignant prostate disease. In: *Anticancer Res.* 25 (6C), S. 4399–4402
- Moce, E.; Blanch, E.; Tomas, C.; Graham, J. K. (2010): Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. In: *Reprod. Domest. Anim.* 45 (Suppl. 2), S. 57–66
- Morrell, J. M. (2006): Update on semen technologies for animal breeding. In: *Reprod. Domest. Anim.* 41 (1), S. 63–67
- Morrell, J. M.; Rodriguez-Martinez, H. (2009): Biomimetic Techniques for Improving Sperm Quality in Animal Breeding: A Review. In: *Open Androl. J.* 1, S. 1–9
- Mortimer, D.; Shu, M. A.; Tan, R. (1986): Standardization and quality control of sperm concentration and sperm motility counts in semen analysis. In: *Hum. Reprod.* 1 (5), S. 299–303
- Mourvaki, E.; Collodel, G.; Moretti, E.; Cosci, I.; Castellini, C. (2008): Distribution of alpha-, gamma (+beta)- and delta-tocopherol in the seminal plasma, spermatozoa and seminal vesicles of rabbit. In: *Androl.* 40 (5), S. 282–285
- Mourvaki, E.; Cardinali, R.; Dal Bosco, A.; Castellini, C. (2010a): In vitro antioxidant activity of the prostatic secretory granules in rabbit semen after exposure to organic peroxides. In: *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8 (16), S. 1-7
- Mourvaki, E.; Cardinali, R.; Roberti, R.; Dal Bosco, A.; Castellini, C. (2010b): Desmosterol, the main sterol in rabbit semen: distribution among semen subfractions and its role in the in vitro spermatozoa acrosome reaction and motility. In: *Asian J. Androl* 12 (6), S. 862–870
- Mukai, C.; Okuno, M. (2004): Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. In: *Biol. Reprod.* 71 (2), S. 540–547
- Nacken, W.; Roth, J.; Sorg, C.; Kerkhoff, C. (2003): S100A9/S100A8: Myeloid representatives of the S100 protein family as prominent players in innate immunity. In: *Microsc. Res. Tech.* 60 (6), S. 569–580
- Nemerson, Y. (1988): Tissue factor and hemostasis. In: *Bood* 71 (1), S. 1–8
- Nilsson, B. O.; Egevad, L.; Jin, M.; Ronquist, G.; Busch, C. (1999a): Distribution of prostasomes in neoplastic epithelial prostate cells. In: *Prostate* 39 (1), S. 36–40
- Nilsson, B. O.; Lennartsson, L.; Carlsson, L.; Nilsson, S.; Ronquist, G. (1999b): Expression of prostasome-like granules by the prostate cancer cell lines PC3, Du145 and LnCaP grown in monolayer. In: *Ups. J. Med. Sci.* 104 (3), S. 199–206
- Nilsson, B. O.; Carlsson, L.; Larsson, A.; Ronquist, G. (2001): Autoantibodies to prostasomes as new markers for prostate cancer. In: *Ups. J. Med. Sci.* 106 (1), S. 43–49

- Nilsson, J.; Skog, J.; Nordstrand, A.; Baranov, V.; Mincheva-Nilsson, L.; Breakefield, X. O.; Widmark, A. (2009): Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer. In: *Brit. J. Cancer* 100 (10), S. 1603–1607
- Nisapakultorn, K.; Ross, K. F.; Herzberg, M. C. (2001a): Calprotectin expression in vitro by oral epithelial cells confers resistance to infection by *Porphyromonas gingivalis*. In: *Infect. Immun.* 69 (7), S. 4242–4247
- Nisapakultorn, K.; Ross, K. F.; Herzberg, M. C. (2001b): Calprotectin expression inhibits bacterial binding to mucosal epithelial cells. In: *Infect. Immun.* 69 (6), S. 3692–3696
- Nöthling, J. O.; Shuttleworth, R.; Haas, K. de; Thompson, P. N. (2005): Homologous prostatic fluid added to frozen-thawed dog spermatozoa prior to intravaginal insemination of bitches resulted in better fertility than albumin-free TALP. In: *Theriogenology* 64 (4), S. 975–991
- Nunez-Martinez, I.; Moran, J. M.; Pena, F. J. (2007): Identification of sperm morphometric subpopulations in the canine ejaculate: do they reflect different subpopulations in sperm chromatin integrity? In: *Zygote* 15 (3), S. 257–266
- O'Flaherty, C.; Lamirande, E. de; Gagnon, C. (2006): Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. In: *Free Radic. Biol. Med.* 41 (4), S. 528–540
- Oliw, E. H.; Fabiani, R.; Johansson, L.; Ronquist, G. (1993): Arachidonic acid 15-lipoxygenase and traces of E prostaglandins in purified human prostasomes. In: *J. Reprod. Fertil.* 99 (1), S. 195–199
- Olsson, I.; Ronquist, G. (1990): Nucleic acid association to human prostasomes. In: *Arch. Androl.* 24 (1), S. 1–10
- Palmerini, C. A.; Carlini, E.; Nicolucci, A.; Arienti, G. (1999): Increase of human spermatozoa intracellular Ca^{2+} concentration after fusion with prostasomes. In: *Cell Calcium* 25 (4), S. 291–296
- Palmerini, C.; Saccardi, C.; Carlini, E.; Fabiani, R.; Arienti, G. (2003): Fusion of prostasomes to human spermatozoa stimulates the acrosome reaction. In: *Fertil. Steril.* 80 (5), S. 1181–1184
- Palmerini, C. A.; Cametti, C.; Sennato, S.; Gaudino, D.; Carlini, E.; Bordini, F.; Arienti, G. (2006): Role of cholesterol, DOTAP, and DPPC in prostatic/spermatozoa interaction and fusion. In: *J. Membr. Biol.* 211 (3), S. 185–190
- Park, K.; Kim, B.; Kang, J.; Nam, T.; Lim, J.; Kim, H. et al. (2011): Ca^{2+} signaling tools acquired from prostasomes are required for progesterone-induced sperm motility. In: *Sci. Signal.* 4 (173)
- Pena, A. I.; Lopez-Lugilde, L.; Barrio, M.; Becerra, J. J.; Quintela, L. A.; Herradon, P. G. (2003): Studies on the intracellular Ca^{2+} concentration of thawed dog spermatozoa: influence of Equex from different sources, two thawing diluents and post-thaw incubation in capacitating conditions. In: *Reprod. Domest. Anim.* 38 (1), S. 27–35

- Perkins, D. N.; Pappin, D. J.; Creasy, D. M.; Cottrell, J. S. (1999): Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. In: *Electrophoresis* 20 (18), S. 3551–3567
- Perrin, B.; Ervasti, J. (2010): The Actin Gene Family: Function Follows Isoform. In: *Cytoskeleton (Hoboken)* 67 (10), S. 630–634
- Pertoft, H.; Laurent, T. C.; Laas, T.; Kagedal, L. (1978): Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). In: *Anal. Biochem.* 88 (1), S. 271–282
- Pesch, S.; Schuler, G.; Wilhelm, E.; Hoffmann, B. (2007): Samengewinnung, -konservierung und künstliche Besamung beim Hund. In: *Tierärztl. Prax.* (35), S. 81–90
- Phillips, T. C.; Dhaliwal, G. K.; Verstegen-Onclin, K. M.; Verstegen, J. P. (2012): Efficacy of four density gradient separation media to remove erythrocytes and nonviable sperm from canine semen. In: *Theriogenology* 77 (1), S. 39–45
- Piehl, L.; Cisale, H.; Torres, N.; Capani, F.; Sterin-Speziale, N.; Hager, A. (2006): Biochemical characterization and membrane fluidity of membranous vesicles isolated from boar seminal plasma. In: *Anim. Reprod. Sci.* 92 (3-4), S. 401–410
- Piehl, L.; Fischman, M.; Hellman, U.; Cisale, H.; Miranda, P. (2013): Boar seminal plasma exosomes: effect on sperm function and protein identification by sequencing. In: *Theriogenology* 79 (7), S. 1071–1082
- Pietrobon, E.; Soria, M.; Dominguez, L.; Monclus, M.; Fornes, M. (2005): Simultaneous activation of PLA2 and PLC are required to promote acrosomal reaction stimulated by progesterone via G-proteins. In: *Mol. Reprod. Dev.* 70 (1), S. 58–63
- Poliakov, A.; Spilman, M.; Dokland, T.; Amling, C.; Mobley, J. (2009): Structural heterogeneity and protein composition of exosome-like vesicles (prostasomes) in human semen. In: *Prostate* 69 (2), S. 159–167
- Pommer, A.; Rutllant, J.; Meyers, S. (2003): Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. In: *Biol. Reprod.* 68 (4), S. 1208–1214
- Pons-Rejraji, H.; Artonne, C.; Sion, B.; Brugnon, F.; Canis, M.; Janny, L.; Grizard, G. (2011): Prostatomes: inhibitors of capacitation and modulators of cellular signalling in human sperm. In: *Int. J. Androl.* 34 (6 Pt 1), S. 568–580
- Pouliot, P.; Plante, I.; Raquil, M.; Tessier, P.; Olivier, M. (2008): Myeloid-related proteins rapidly modulate macrophage nitric oxide production during innate immune response. In: *J. Immunol.* 181 (5), S. 3595–3601
- Poulos, A.; White, I. G. (1973): The phospholipid composition of human spermatozoa and seminal plasma. In: *J. Reprod. Fertil.* 35 (2), S. 265–272

- Principe, S.; Jones, E.; Kim, Y.; Sinha, A.; Nyalwidhe, J.; Brooks, J. et al. (2013): In-depth proteomic analyses of exosomes isolated from expressed prostatic secretions in urine. In: *Proteomics* 13 (10-11), S. 1667–1671
- Prinosilova, P.; Kopecka, V. (2012): Cryopreservation of canine semen contaminated with blood. In: 7th ISCFR, Whistler, Canada, 26.-29.07.2012
- Purswell B J, Althouse G, Root MV (1992): Guidelines for Using the Canine Breeding Soundness Evaluation Form. In: *Theriogen. Handb.* 8, S. 51-59
- Rammes, A.; Roth, J.; Goebeler, M.; Klempt, M.; Hartmann, M.; Sorg, C. (1997): Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. In: *J. Biol. Chem.* 272 (14), S. 9496–9502
- Rejraji, H.; Drevet, J. (2003): La glutathion peroxydase 5 murine. Modèle d'étude de l'activité sécrétoire de l'épididyme et des mécanismes de transport et d'association protéiques au spermatozoïde. Dissertationsschrift, Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand), Frankreich
- Rejraji, H.; Sion, B.; Prensier, G.; Carreras, M.; Motta, C.; Frenoux, J. et al. (2006): Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. In: *Biol. Reprod.* 74, S. 1104-1113
- Renneberg, H.; Konrad, L.; Dammshäuser, I.; Seitz, J.; Aumüller, G. (1997): Immunohistochemistry of prostasomes from human semen. In: *Prostate* 30 (2), S. 98–106
- Renneberg, H.; Albrecht, M.; Kurek, R.; Krause, E.; Lottspeich, F.; Aumüller, G.; Wilhelm, B. (2001): Identification and characterization of neutral endopeptidase (EC 3. 4. 24. 11) from human prostasomes-localization in prostatic tissue and cell lines. In: *Prostate* 46 (3), S. 173–183
- Riesenbeck, A.; Völger, D.; Hoffmann, B. (2001): Praxisnahe Bestimmung von Vitalitätsparametern zur Beurteilung von Rüdensperma. In: *Tierärztl. Prax.* (29), S. 116–120
- Rijsselaere, T.; van Soom, A.; Maes, D.; Kruif, A. de (2003): Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. In: *Theriogenology* 60 (8), S. 1553–1568
- Rijsselaere, T.; van Soom, A.; Hoflack, G.; Maes, D.; Kruif, A. de (2004): Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyzer. In: *Theriogenology* 62 (7), S. 1292–1306
- Rijsselaere, T.; Maes, D.; Hoflack, G.; Kruif, A. de; van Soom, A. (2007): Effect of body weight, age and breeding history on canine sperm quality parameters measured by the Hamilton-Thorne analyser. In: *Reprod. Domest. Anim.* 42 (2), S. 143–148
- Rijsselaere, T.; van Soom, A.; Maes, D.; Nizanski, W. (2012): Computer-assisted sperm analysis in dogs and cats: an update after 20 years. In: *Reprod. Domest. Anim.* 47 (Suppl. 6), S. 204–207

- Rodenas, C.; Parrilla, I.; Roca, J.; Martinez, E.; Lucas, X. (2014): Effects of Rapid Cooling Prior to Freezing on the Quality of Canine Cryopreserved Spermatozoa. In: J. Reprod. Dev. 60 (7), S. 784–790
- Rodriguez-Gil, J. E.; Montserrat, A.; Rigau, T. (1994): Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. In: Theriogenology 42 (5), S. 815–829
- Roessner, C.; Paasch, U.; Glander, H-J; Grunewald, S. (2010): Activity of nitric oxide synthase in mature and immature human spermatozoa. In: Andrologia 42 (2), S. 132–137
- Ronquist, G.; Brody, I. (1985): The prostasome: its secretion and function in man. In: Biochim. Biophys. Acta 822 (2), S. 203–218
- Ronquist, G.; Frithz, G. G. (1986): Prostrasomes in human semen contain ADP and GDP. In: Acta Eur. Fertil. 17 (4), S. 273–276
- Ronquist, G.; Brody, I.; Gottfries, A.; Stegmayr, B. (1978a): Mg²⁺-stimulated and Ca²⁺-stimulated adenosine-triphosphatase in human prostatic fluid.1. In: Andrologia 10 (4), S. 261–272
- Ronquist, G.; Gottfries, A.; Brody, I.; Stegmayr, B. (1978b): Mg²⁺ and Ca²⁺-stimulated adenosine-triphosphatase in human prostatic fluid.2. In: Andrologia 10 (6), S. 427–433
- Ronquist, G.; Nilsson, B. O.; Hjertén, S. (1990): Interaction between prostasomes and spermatozoa from human semen. In: Arch. Androl. 24 (2), S. 147–157
- Ronquist, K.; Carlsson, L.; Ronquist, G.; Nilsson, S.; Larsson, A. (2006): Prostate-derived proteins capable of eliciting an immune response in prostate cancer patients. In: Int. J. Cancer 119 (4), S. 847–853
- Ronquist, G. (2009): Some Characteristics of Human Prostrasomes and Their Relationship to Prostate Cancer. In: Uppsala: Acta Univers. Ups. (Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine, 451)
- Ronquist, G.; Larsson, A.; Ronquist, G.; Isaksson, A.; Hreinsson, J.; Carlsson, L.; Stavreus-Evers, A. (2011): Prostrasomal DNA characterization and transfer into human sperm. In: Mol. Reprod. Dev. 78 (7), S. 467–476
- Ronquist, G.; Larsson, A.; Stavreus-Evers, A.; Ronquist, G. (2012): Prostrasomes are heterogeneous regarding size and appearance but affiliated to one DNA-containing exosome family. In: Prostate 72 (16), S. 1736–1745
- Ronquist, G.; Ek, B.; Ronquist, G.; Morrell, J.; Carlsson, L.; Larsson, A. (2013a): Biochemical characterization of stallion prostasomes and comparison to their human counterparts. In: Syst. Biol. Reprod. Med. 59 (6), S. 297–303
- Ronquist, K.; Ek, B.; Morrell, J.; Stavreus-Evers, A.; Ström Holst, B.; Humblot, P. et al. (2013b): Prostrasomes from four different species are able to produce extracellular adenosine triphosphate (ATP). In: Biochim. Biophys. Acta 1830 (10), S. 4604–4610

- Ronquist, K.; Ek, B.; Stavreus-Evers, A.; Larsson, A.; Ronquist, G. (2013c): Human prostasomes express glycolytic enzymes with capacity for ATP production. In: *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 304 (6), S. e576-82
- Rooney, I. A.; Atkinson, J. P.; Krul, E. S.; Schonfeld, G.; Polakoski, K.; Saffitz, J. E.; Morgan, B. P. (1993): Physiologic relevance of the membrane attack complex inhibitory protein CD59 in human seminal plasma: CD59 is present on extracellular organelles (prostasomes), binds cell membranes, and inhibits complement-mediated lysis. In: *J. Exp. Med.* 177 (5), S. 1409–1420
- Rooney, I. A.; Heuser, J. E.; Atkinson, J. P. (1996): GPI-anchored complement regulatory proteins in seminal plasma. An analysis of their physical condition and the mechanisms of their binding to exogenous cells. In: *J. Clin. Invest.* 97 (7), S. 1675–1686
- Rota, A.; Pena, A. I.; Linde-Forsberg, C.; Rodriguez-Martinez, H. (1999): In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. In: *Anim. Reprod. Sci.* 57 (3-4), S. 199–215
- Rota, A.; Milani, C.; Romagnoli, S. (2007): Effect of post-thaw dilution with autologous prostatic fluid on dog semen motility and sperm acrosome status. In: *Theriogenology* 67 (3), S. 520–525
- Rozengurt, E.; Heppel, L. A.; Friedberg, I. (1977): Effect of exogenous ATP on the permeability properties of transformed cultures of mouse cell lines. In: *J. Biol. Chem.* 252 (13), S. 4584–4590
- Ryckman, C.; Vandal, K.; Rouleau, P.; Talbot, M.; Tessier, P. (2003): Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. In: *J. Immunol.* 170 (6), S. 3233–3242
- Saez, F.; Motta, C.; Boucher, D.; Grizard, G. (1998): Antioxidant capacity of prostasomes in human semen. In: *Mol. Hum. Reprod.* 4 (7), S. 667–672
- Saez, F.; Motta, C.; Boucher, D.; Grizard, G. (2000): Prostasomes inhibit the NADPH oxidase activity of human neutrophils. In: *Mol. Hum. Reprod.* 6 (10), S. 883–891
- Sahlén, G.; Ahlander, A.; Frost, A.; Ronquist, G.; Norlén, B.; Nilsson, B. (2004): Prostasomes are secreted from poorly differentiated cells of prostate cancer metastases. In: *Prostate* 61 (3), S. 291–297
- Sahlén, G. (2007): Formation, storage and secretion of prostasomes in benign and malignant cells and their immunogenicity in prostate cancer patients. In: *Uppsala: Acta Univers. Ups.* (Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine, 226)
- Sahlén, G.; Nilsson, O.; Larsson, A.; Carlsson, L.; Norlén, B.; Ronquist, G. (2010): Secretions from seminal vesicles lack characteristic markers for prostasomes. In: *Ups. J. Med. Sci.* 115 (2), S. 107–112
- Sandvig, K.; Llorente, A. (2012): Proteomic analysis of microvesicles released by the human prostate cancer cell line PC-3. In: *Mol. Cell Proteomics* 11 (7), M111.012914-1 bis -11

- Schäfer-Somi, S.; Kluger, S.; Knapp, E.; Klein, D.; Aurich, C. (2006): Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. In: *Theriogenology* 66 (2), S. 173–182
- Schäfer-Somi, S.; Aurich, C. (2007): Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. In: *Anim. Reprod. Sci.* 102 (1–2), S. 1–13
- Schrimpf, S. P.; Hellman, U.; Carlsson, L.; Larsson, A.; Ronquist, G.; Nilsson, B. O. (1999): Identification of dipeptidyl peptidase IV as the antigen of a monoclonal anti-prostasome antibody. In: *Prostate* 38 (1), S. 35–39
- Schwarz, A.; Wennemuth, G.; Post, H.; Brandenburger, T.; Aumuller, G.; Wilhelm, B. (2013): Vesicular transfer of membrane components to bovine epididymal spermatozoa. In: *Cell. Tissue Res.* 353 (3), S. 549–561
- Seager, S.W.J. (1969): Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. In: *A.I. Digest.* (17), S. 6–7
- Shen, M. R.; Linden, J.; Chiang, P. H.; Chen, S. S.; Wu, S. N. (1993): Adenosine stimulates human sperm motility via A2 receptors. In: *J. Pharm. Pharmacol.* 45 (7), S. 650–653
- Siciliano, L.; Marcianò, V.; Carpino, A. (2008): Prostasome-like vesicles stimulate acrosome reaction of pig spermatozoa. In: *Reprod. Biol. Endocrinol.* 6 (5), S. 1–7
- Silva, L. D.; Onclin, K.; Lejeune, B.; Versteegen, J. P. (1996): Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. In: *Vet. Rec.* 138 (7), S. 154–157
- Silva, A. R.; de Cassia Soares Cardoso, R.; Uchoa, D. C.; MacHado da Silva, L. D. (2002): Effect of tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. In: *Vet. J.* 164 (3), S. 244–246
- Silva, A. R.; Fontenele-Neto, J. D.; de Cássia-Soares Cardoso, R.; da Silva, L. D. M.; Chirinéa, V. H.; Lopes, M. D. (2009): Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. In: *Braz. Anim. Sci.* 10 (2), S. 595–601
- Simpson, A.; Swan, M.; White, I. (1986): Action of phosphatidylcholine in protecting ram sperm from cold shock. In: *Gamete Res.* 15 (1), S. 43–56
- Simpson, K. L.; Holmes, C. H. (1994): Presence of the complement-regulatory protein membrane cofactor protein (MCP, CD46) as a membrane-associated product in seminal plasma. In: *J. Reprod. Fertil.* 102, S. 419–424
- Sirivaidyapong, S.; Ursem, P.; Bevers, M. M.; Colenbrander, B. (2001): Effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen-thawed dog spermatozoa. In: *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 57, S. 383–386
- Skibinski, G.; Kelly, R. W.; Harkiss, D.; James, K. (1992): Immunosuppression by human seminal plasma--extracellular organelles (prostasomes) modulate activity of phagocytic cells. In: *Am. J. Reprod. Immunol.* 28 (2), S. 97–103

- Skibinski, G.; Kelly, R. W.; James, K. (1994): Expression of a common secretory granule specific protein as a marker for the extracellular organelles (prostasomes) in human semen. In: *Fertil. Steril.* 61 (4), S. 755–759
- Smith, S. C.; England, G. C. (2001): Effect of technical settings and semen handling upon motility characteristics of dog spermatozoa measured using computer-aided sperm analysis. In: *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 57, S. 151–159
- Songsasen, N.; Yu, I.; Murton, S.; Paccamonti, D. L.; Eilts, B. E.; Godke, R. A.; Leibo, S. P. (2002): Osmotic sensitivity of canine spermatozoa. In: *Cryobiology* 44 (1), S. 79–90
- Stănescu M., Bîrțoiu, I. (2012): Freezing of dog's sperm: a review. In: *Rom. Biotech. Lett.* 17 (5), S. 7709–7716
- Stănescu M., Bîrțoiu, I., Deleuze, S (2012): Influence of autologous prostatic fluid added to frozen-thawed dog semen. In: *Sci. Works C Vet. Med.* 58 (4), S. 362–371
- Stark, K.; Schauer, L.; Sahlén, G.; Ronquist, G.; Oliw, E. (2004): Expression of CYP4F12 in gastrointestinal and urogenital epithelia. In: *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 94 (4), S. 177–183
- Stegmayr, B.; Gottfries, A.; Ronquist, G.; Brody, I. (1980): Reduced activity of Mg²⁺-dependent and Ca²⁺-dependent adenosine-triphosphatase in seminal fluid of patients with oligozoospermia. In: *Scand. J. Urol. Nephrol.* 14 (2), S. 129–134
- Stegmayr, B.; Ronquist, G.; Kollberg, H.; Brody, I. (1981): Analysis of ejaculates from patients with cystic fibrosis. In: *Ultrastruct. Pathol.* 2 (4), S. 357–363
- Stegmayr, B.; Ronquist, G. (1982a): Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. In: *Urol. Res.* 10 (5), S. 253–257
- Stegmayr, B.; Ronquist, G. (1982b): Stimulation of sperm progressive motility by organelles in human seminal plasma. In: *Scand. J. Urol. Nephrol.* 16 (2), S. 85–90
- Stegmayr, B.; Brody, I.; Ronquist, G. (1982c): A biochemical and ultrastructural study on the endogenous protein kinase activity of secretory granule membranes of prostatic origin in human seminal plasma. In: *J. Ultra. Mol. Struct. R.* 78 (2), S. 206–214
- Stegmayr, B.; Berggren, P. O.; Ronquist, G.; Hellman, B. (1982d): Calcium, magnesium, and zinc contents in organelles of prostatic origin in human seminal plasma. In: *Scand. J. Urol. Nephrol.* 16 (3), S. 199–203
- Stewart, A.; Delves, G.; Birch, B.; Cooper, A.; Lwaleed, B. (2009): Antiprostasome antibodies are not an appropriate prognostic marker for prostate cancer. In: *Scand. J. Urol. Nephrol.* 43 (2), S. 104–108
- Stridsberg, M.; Fabiani, R.; Lukinius, A.; Ronquist, G. (1996): Prostasomes are neuroendocrine-like vesicles in human semen. In: *Prostate* 29 (5), S. 287–295
- Striz, I.; Trebichavsky, I. (2004): Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. In: *Physiol. Res.* 53 (3), S. 245–253

- Strunker, T.; Goodwin, N.; Brenker, C.; Kashikar, N.; Weyand, I.; Seifert, R.; Kaupp, U. (2011): The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca^{2+} influx in human sperm. In: *Nature* 471 (7338), S. 382–386
- Strzezek, R.; Fraser, L. (2009): Characteristics of spermatozoa of whole ejaculate and sperm-rich fraction of dog semen following exposure to media varying in osmolality. In: *Reprod. Biol.* 9 (2), S. 113–126
- Suarez, S. S.; Varosi, S. M.; Dai, X. (1993): Intracellular calcium increases with hyperactivation in intact, moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (10), S. 4660–4664
- Subiran, N.; Agirregoitia, E.; Valdivia, A.; Ochoa, C.; Casis, L.; Irazusta, J. (2008 May): Expression of enkephalin-degrading enzymes in human semen and implications for sperm motility. In: *Fertil. Steril.* 89 (5, Suppl. 3), S. 1571–1577
- Sullivan, R.; Saez, F.; Girouard, J.; Frenette, G. (2005): Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. In: *Blood Cell. Mol. Dis.* 35 (1), S. 1–10
- Sullivan, Robert (2008): Principal cells' apocrine secretion of epididymosomes and its function in sperm maturation. In: *Biol. Reprod.* 78 (90), Abstract 163
- Suzuki, M.; Suzuki, H.; Sugimoto, Y.; Sugiyama, Y. (2003): ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. In: *J. Biol. Chem.* 278 (25), S. 22644–22649
- Szyperski, T.; Fernandez, C.; Mumenthaler, C.; Wuthrich, K. (1998): Structure comparison of human glioma pathogenesis-related protein GliPR and the plant pathogenesis-related protein P14a indicates a functional link between the human immune system and a plant defense system. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (5), S. 2262–2266
- Tappel, A. (2005): Lysosomal and prostasomal hydrolytic enzymes and redox processes and initiation of prostate cancer. In: *Med. Hypotheses* 64 (6), S. 1170–1172
- Tarazona, R.; Delgado, E.; Guarnizo, M. C.; Roncero, R. G.; Morgado, S.; Sánchez-Correa, B. et al. (2011): Human prostasomes express CD48 and interfere with NK cell function. In: *Immunobiology* 216 (1-2), S. 41–46
- Tardif, S. (2001): Capacitation Is Associated with Tyrosine Phosphorylation and Tyrosine Kinase-Like Activity of Pig Sperm Proteins. In: *Biol. Reprod.* 65 (3), S. 784–792
- Tavoosidana, G.; Ronquist, G.; Darmanis, S.; Yan, J.; Carlsson, L.; Di Wu et al. (2011): Multiple recognition assay reveals prostasomes as promising plasma biomarkers for prostate cancer. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108 (21), S. 8809–8814
- Tejerina, F.; Morrell, J.; Petterson, J.; Dalin, A.-M.; Rodriguez-Martinez, H. (2009): Routine assessment of motility of ejaculated stallion spermatozoa using a novel computer-assisted motility analyzer (Qualisperm™). In: *Anim. Reprod. Sci.* 6 (2), S. 380–385

- Thimon, V.; Frenette, G.; Saez, F.; Thabet, M.; Sullivan, R. (2008): Protein composition of human epididymosomes collected during surgical vasectomy reversal: a proteomic and genomic approach. In: *Hum. Reprod.* 23 (8), S. 1698–1707
- Trajkovic, K.; Hsu, C.; Chiantia, S.; Rajendran, L.; Wenzel, D.; Wieland, F. et al. (2008): Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. In: *Science* 319 (5867), S. 1244–1247
- Utleg, A.; Yi, E.; Xie, T.; Shannon, P.; White, J.; Goodlett, D. et al. (2003): Proteomic analysis of human prostasomes. In: *Prostate* 56 (2), S. 150–161
- Valdivia, A.; Irazusta, J.; Fernández, D.; Múgica, J.; Ochoa, C.; Casis, L. (2004): Pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase in human semen: increased activity in necrozoospermia. In: *Regul. Pept.* 122 (2), S. 79–84
- Vanhoof, G.; Meester, I. de; van Sande, M.; Scharpe, S.; Yaron, A. (1992): Distribution of proline-specific aminopeptidases in human tissues and body fluids. In: *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Bio.* 30 (6), S. 333–338
- Vardjan, N.; Jorgacevski, J.; Zorec, R. (2013): Fusion pores, SNAREs, and exocytosis. In: *Neuroscientist* 19 (2), S. 160–174
- Vazquez-Levin, M.; Marin-Briggiler, C.; Veaute, C. (2014): Antisperm Antibodies: Invaluable Tools Toward the Identification of Sperm Proteins Involved in Fertilization. In: *Am. J. Reprod. Immunol.* 72 (2), S. 206–218
- Vicente-Fiel, S.; Palacín, I.; Santolaria, P.; Fantova, E.; Quintín-Casorrán, F. J.; Sevilla-Mur, E.; Yániz, J. L. (2014): In vitro assessment of sperm quality from rams of high and low field fertility. In: *Anim. Reprod. Scie.* 146 (1–2), S. 15–20
- Visconti, P. E.; Bailey, J. L.; Moore, G. D.; Pan, D.; Olds-Clarke, P.; Kopf, G. S. (1995): Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. In: *Development* 121 (4), S. 1129–1137
- Visconti, P.; Ning, X.; Fornés, M.; Alvarez, J.; Stein, P.; Connors, S.; Kopf, G. (1999): Cholesterol Efflux-Mediated Signal Transduction in Mammalian Sperm: Cholesterol Release Signals an Increase in Protein Tyrosine Phosphorylation during Mouse Sperm Capacitation. In: *Dev. Biol.* 214 (2), S. 429–443
- Vivacqua, A.; Siciliano, L.; Sabato, M.; Palma, A.; Carpino, A. (2004): Prostasomes as zinc ligands in human seminal plasma. In: *Int. J. Androl.* 27 (1), S. 27–31
- Vogl, T.; Ludwig, S.; Goebeler, M.; Streyl, A.; Thorey, I.; Reichelt, R. et al. (2004): MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. In: *Blood* 104 (13), S. 4260–4268
- Vogl, T.; Tenbrock, K.; Ludwig, S.; Leukert, N.; Ehrhardt, C.; van Zoelen, M. et al. (2007): Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. In: *Nat. Med.* 13 (9), S. 1042–1049

- Vuorela, P.; Vuorela, H.; Suppula, H.; Hiltunen, R. (1996): Development of quantitative TLC assay for phospholipid products. In: JPC-J. Planar Chromat. 9 (4), S. 254–259
- Wang, J.; Cai, Y.; Xu, H.; Zhao, J.; Xu, X.; Han, Y. et al. (2004): Expression of MRP14 gene is frequently down-regulated in Chinese human esophageal cancer. In: Cell. Res. 14 (1), S. 46–53
- Wang, S.; Huang, Y.; Li, B.; Xia, X.; Wang, Z. (2003): Detection and clinical significance of phospholipase A2 in semen of male infertile patients. (Abstract) In: Zhonghua Nan Ke Xue 9 (2), S. 90–93
- Watson, P. F. (2000): The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. In: Anim. Reprod. Sci. 60-61, S. 481–492
- Wautier, M. P.; Chappey, O.; Corda, S.; Stern, D. M.; Schmidt, A. M.; Wautier, J. L. (2001): Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. In: Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 280 (5), S. e685-e694
- Wiedenmann, B.; Franke, W. W. (1985): Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. In: Cell. 41 (3), S. 1017–1028
- Yamashiro (2009): Influence of the Prostatic Fluid from the First and Third Fractions of the Ejaculates on the Cryosurvival of Poodle Dog Sperm. In: Am. J. Anim. Vet. Scie. 4 (1), S. 14–20
- Yanagimachi, R.; Kamiguchi, Y.; Mikamo, K.; Suzuki, F.; Yanagimachi, H. (1985): Maturation of spermatozoa in the epididymis of the Chinese hamster. In: Am. J. Anat. 172 (4), S. 317–330
- Yanamandra, K.; Alexeyev, O.; Zamotin, V.; Srivastava, V.; Shchukarev, A.; Brorsson, A. et al. (2009): Amyloid Formation by the Pro-Inflammatory S100A8/A9 Proteins in the Ageing Prostate. In: PLoS One 4 (5), e5562, S. 1-14
- Yeagle, P. L. (1989): Lipid regulation of cell membrane structure and function. In: Faseb J. 3 (7), S. 1833–1842
- Yeung, C. H.; Cooper, T. G.; Nieschlag, E. (1997): A technique for standardization and quality control of subjective sperm motility assessments in semen analysis. In: Fertil. Steril. 67 (6), S. 1156–1158
- Yu, I.; Songsasen, N.; Godke, R. A.; Leibo, S. P. (2002): Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. In: Cryobiology 44 (1), S. 62–78
- Zelli, R.; Bellezza, I.; Rambotti, M. G.; Minelli, A.; Polisca, A. (2013): Ultrastructural and enzymatic activity of membranous vesicles isolated from canine seminal plasma. In: Reprod. Domest. Anim. 48 (2), S. 252–257
- Zucchi, A.; Mearini, E.; Porena, M.; Carlini, E.; Saccardi, C.; Arienti, G.; Palmerini, C. (2006): Cytosolic calcium levels in spermatozoa are modulated differently in healthy subjects and patients with varicocele. In: Fertil. Steril. 85 (1), S. 144–148

9 Anhang

9.1 Geräte

Lichtmikroskope:	Hund H 500, , Helmut Hund GmbH, Wetzlar; Objektive: 10x/0,25; 20x/0,35; 40x/0,65; 100x/1,25 (Oel); Okular: WF 10x
	Leica CM E, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar; Objektive: E2 PLAN 4x/0,10; E2 PLAN Ph 10x/0,25; E2 PLAN Ph 40x/0,65; Okular: E ₂ WF 10x/18
	Olympus BX 41 TF, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg; Objektiv: Negativ- Hochkontrast-Objektiv UPlan FINH, 20x/0,50 Ph1; Okular WHN 10x
Heiztische für die Lichtmikroskopie:	Microscope stage, Typ H T 200, Minitüb GmbH, Tiefenbach; Ref.nr.: 12055/0200
	Microscope stage, Typ H T 300 W („Steuergerät HT300W“), Minitüb GmbH, Tiefenbach, Ref.nr: 12055/0302
Pipetten:	Eppendorf Reference autoclavable 20 µl, Eppendorf AG, Hamburg
	Eppendorf Reference 10-100 µl, Eppendorf AG, Hamburg
	Eppendorf Reference 100- 1000 µl, Eppendorf AG, Hamburg
	Eppendorf Research 20 µl, Eppendorf AG, Hamburg
	Eppendorf Research plus 100-1000 µl, Eppendorf AG, Hamburg
	Rainin Pipet-Lite™ XLS™, LTS, 0,5-10 µl, Mettler Toledo (Schweiz) GmbH, Greifensee
	Pipette Nr. 8078649 oder 8078637, 10-100 µl, Carl Roth GmbH Co.KG, Karlsruhe

	Pipette Nr. 8025512, 100- 1000 µl, Carl Roth GmbH Co.KG, Karlsruhe
Neubauer-Zählkammer:	Hämazytometer, Tiefe 0,1 mm, Fläche 0,0025 mm ² , HBG Henneberg-Sander GmbH, Gießen
	Deckgläser, optisch plan geschliffen für Hämazytometer, 20 x 26 mm, Ref.nr. 3401, megro GmbH & Co.KG, Wesel;
Zentrifugen:	Rotina 38, Rotor 1794, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
	Biofuge fresco, Bestellnr.: 75005510/01, Heraeus, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau;
	Optima Co L-70, Rotor TI-50, Seriennummer.: Co L95L40, Beckman Coulter GmbH, Krefeld;
Zentrifugengläser:	Duran®, Spitzboden 30°, 16x 100 mm, Carl Roth GmbH Co.KG, Karlsruhe
	Nalgene® Zentrifugenröhrchen (für Ultrazentrifugation), 10 ml, VWR International GmbH, Wien, Österreich
Analysewaage:	Sartorius Research R 200 D, Sartorius GmbH, Göttingen
pH-Meter:	Digital-pH-Meter 646, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
	pH-Elektrode Blue Line 22, Schott Geräte GmbH, Mainz
Magnetrührer:	IKA® Combimag, Typ RET Nr. 68012, IKA®-Werke GmbH & Co.KG, Staufen
Gelchromatographie-Säule:	Glass Econo-Column, 15 cm x 1,5 cm, BioRad Laboratories GmbH, München
Taumel-Schüttler:	Typ Reax 3, Seriennummer: 49313820, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach

Thermoblock:	Model TM 130-6, Seriennummer: 1369015, HLC-Haep Labor Consult, Bovenden
Vortexer:	Type REAX 2000. No. 541.19000.00, Seriennummer 129448632, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Rotationsmischer:	Typ 3300, <i>Eppendorf Gerätebau, Netheler & Hinz GmbH, Hamburg</i>
Plattenleser:	iEMS Reader MF, Typ 1401, Seriennummer: 140100-572, MTX Lab Systems Inc., Virginia, USA Software Genesis, Version 3.00, Copyright 1993-1998, Life Sciences [UK] Ltd.
Ultraschallgerät:	Bandelin Sonopuls (HD 2070 M 872, electronic Gerätetyp GM 2070, Prod.Nr.: 517.00001672.046; Bandelin, Gerätetyp: 2070, Prod.-Nr. 519.00001453.046 (SH 70 G; MS 73), Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Ultraschallbad:	Sonobad (Ultraschallgenerator) Laboson 200, T460-H, Bender & Hobein GmbH Labortechnik Chemikalien, Bruchsal
Gel-Caster (SDS-PAGE):	SE 245 Hoefer, Dual Gel Caster, Pierce Chemical Co., USA Hoefer, SE 260, Mini vertical gel electrophoresis unit, Pierce Chemical Co., USA Rectangular Glass plates, 10 x 10 cm, Hoefer, Pierce Chemical Co., USA Aluminaplatte, 10,6 cm x 10,2 cm, notched, biostep GmbH, Jahnsdorf
Wasserbad:	GFL 1083, Gesellschaft für Labortechnik mbH Burgwedel Typ: WNB 45, Memmert GmbH u. Co KG, Schwabach
Wärmeschrank:	L 50; Nr. 780 363, Memmert GmbH u. Co KG,

	Schwabach
	FB 420, Fab.nr.: 0005316, Heraeus Materials Technology GmbH & Co. KG, Hanau
Power supply (SDS-PAGE):	Electrophoresis Power Supply EPS 301, Amersham Biosciences, GE Healthcare Europe GmbH (Schweiz)
Wasserkühler:	Thermomix 1419, Typ 850092, Braun, Melsungen
Zählmaschine:	Zählmaschine Assistent 345/15, Typ: AC 15-PC, Nr.: 345/615, MAGV Laborbedarf Rabenau-Condorf, Karl Hecht GmbH & Co KG Sondheim

9.2 Verbrauchsmaterialien

Kammern für CASA-Messungen:	Leja Standard Count 4 Chamber, Slide 20 micron, Art.no. SC-20-01-04-B, 25 slides, Leja Products,B.V., The Netherlands
Objektträger:	50 Objektträger Microscope Slides, Kanten geschnitten ohne Mathrand, REF 1900000010 ISO 8037/1, IDL GmbH & Co KG, Nidderau
Deckgläser:	IDL Deckgläser, MAGV, IDL GmbH & Co KG, Nidderau
Pipettenspitzen	Gelbe Pipettenspitzen, 500 Stück, 200 µl, REF 70.760.002, SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht
	Blaue Spitzen, 250 Stück, 1000 µl, REF 70.762, SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht
	Farblose Pipettenspitzen, 1000 Stück, 10 µl, REF 70.1115, SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht
96-Well-Platte:	Cellstar, tissue culture plate 96 W, No. 655180, Greiner Bio-One GmbH , Frickenhausen
Reaktionsgefäße:	1,5 ml Reaktionsgefäße Eppendorf Tubes®, 500 Stück, Bestellnummer: 0030 125.150,

	Eppendorf AG, Hamburg
	1,5 ml Reaktionsgefäße, Polypropylen, farblos, Artikelnummer 4182.1, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
	Multi®-Safe Seal® Tubes, farblos, 0,5 ml, 1000 Stück, Artikelnummer 7060.1, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
	Eppis 0,2 ml grün, 3000 Stck. REF 72.737.992, Multiply-Pro Farbmix, SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht
	Reagiergefäß 0,5 ml Low binding, REF 72.704.600, SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht
	Falcontube S: 100 Cellstar® Tubes, 15 ml, Cat-No 188 271, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Midi-Paillette:	Paillette 0,5 ml, Minitüb GmbH, Tiefenbach
Plastikspritze:	2ml Spitze, Injekt® B Braun 2 ml/Luer solo Ref 460627 V, B Braun Melsungen AG, Melsungen
Parafilm:	American National Can ™, Neenah, WI54956, U.S.A. Chicago, IL 60631
9.3 Chemikalien	
Bovines Serumalbumin:	Albumin Fraktion V, ≥ 98%, pulv., bovin, 500g, Charge 25253774, Artikelnummer 8076.3, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Sephadex G 200:	Trockenpulver, Particle size 40-120 µm, bed volume per g dry gel: 30-40 ml, 100g, Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala, Sweden
NaN ₃ :	Natriumazid, reinst, 250 g, E. Merck, Darmstadt
Proteinbestimmung:	BCA Protein Assay Kit, Thermo scientific Pierce, Pierce Protein research products, 3747 N. Meridian Rd, Rockford, U.S.A.

Ammoniumperoxodisulfat:	50g, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
TEMED:	25 ml, 99%, pro analysi, f.d. Elektrophorese, $C_6H_{16}N_2$, M 116,21, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
10% SDS Stammlösung:	Rotiphorese® 10x SDS-PAGE, 1l, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
30% Acrylamid:	Rotiphorese Gel® (37,5 :1), 500 ml, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Isopropanol:	Rotipuran®, ≥99,7%, p.a., C_3H_8O , Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ethanol:	99,5%, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Glycerin/-ol:	≥99,5%, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Protein Ladder:	PageRuler Prestained Protein Ladder, 250 µl, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat:	500 g, pro analysi, $C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$, 294,1 g/mol, Merck KGaA, Darmstadt
D(-) Fructose:	500 g, Charge 320155791, Artikelnummer 4981, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

9.4 Analyseeinstellungen des SpermVision™-Systems

SpermVision™ Version 3.5.6.2.-Juli 2009,
Benutzerhandbuch Manual 12049/0586

Motilitätsanalyse

- | | |
|------------------------------------|--|
| • Probenschichtdicke: | 20 µm |
| • Pixel/µm-Verhältnis: | 168 zu 100 |
| • Spermienerkennung: | Fläche von 20 bis 60 µm ² |
| • Zählkriterien: | 4000 Spermien oder 8 Felder
(Konzentrationsmessung: 8 Felder) |
| • Punkte bei der Spermienbewegung: | 11 |
| • Level 1-Klassifizierung: | |
| • unbewegliche Spermien: | AOC < 9,5°
(Darstellungsfarbe rotbraun) |
| • lokalbewegliche Spermien: | DSL < 6,0 µm
(Darstellungsfarbe gelb) |
| • vorwärtsbewegliche Spermien: | AOC ≥ 9,5° und DSL ≥ 6,0 µm, d.h. |

jede Zelle, die nicht als „unbeweglich“ oder „lokalbeweglich“ eingestuft wurde.
(Darstellungsfarbe hellgrün)

- Level 2-Klassifizierung:
Die Level 2-Klassifizierung wird bei der Untersuchung der vorwärtsbeweglichen Spermien angewendet.
 - hyperaktive Spermien: VCL > 118 $\mu\text{m/s}$, ALH > 6,5 μm und LIN < 0,5
(Darstellungsfarbe blau)
 - lineare Spermien: STR > 0,9 und LIN > 0,5
(Darstellungsfarbe hellgrün)
 - nicht lineare Spermien: STR \leq 0,9 und LIN \leq 0,5
(Darstellungsfarbe hellblau)
 - kurvilineare Spermien: DAP/Radius \geq 3 und LIN < 0,5
(Darstellungsfarbe weiß)

Sonstige Einstellungen

- erlaubte Standardabweichung: 15%
- Lichteinstellung bei Motilitätsanalyse: 80 bis 110
- Volumen pro Messkammer: 2,5 μl
- Analysetemperatur: 37°C
- Framerate (Bildfrequenz): 60 Frames/s

9.5 Rezepte

9.5.1 SDS-PAGE

9.5.1.1 Zusammensetzung des Trenngels (11,5%)

- 2,875 ml 30% Acrylamid-Stammlösung
- 2,813 ml Trenngel-Puffer
- 1,671 ml A. bidest.
- 75 μl 10% SDS-Stammlösung
- 60 μl 10% APS (Ammoniumperoxodisulfat; frisch angesetzt)
- 6 μl TEMED

9.5.1.2 Zusammensetzung Trenngel (7,5%)

- 1,875 ml 30% Acrylamid-Stammlösung
- 2,813 ml Trenngel-Puffer
- 2,671 ml A. bidest.
- 75 μl 10% SDS-Stammlösung
- 60 μl 10% APS (frisch angesetzt)
- 6 μl TEMED

9.5.1.3 Zusammensetzung Sammelgel (5%)

- 0,417 ml 30% Acrylamid-Stammlösung

- 0,313 ml Sammelgelpuffer
- 1,731 ml A. bidest.
- 25 µl 10% SDS-Stammlösung
- 13 µl 10% APS
- 3 µl TEMED

9.5.1.4 Gelkonservierer

- Ethanol 15 ml
- Glycerol 10 ml
- A. bidest. 75 ml

9.5.1.5 SDS-Stammlösung (10%)

- 10g SDS ad 100 ml A. dest.

9.5.1.6 APS (10%)

- 0,1g APS ad 1 ml A. dest.

9.5.1.7 Loading Dye (3x)

- 1,75 ml Sammelgelpuffer
- 1,5 ml Glycerin
- 5 ml 10% SDS
- 0,5 ml beta-Mercaptoethanol
- 1,25 ml Bromphenolblau
 - Gesättigt in 0,1% Ethanol (100 µl Ethanol ad 100 ml A. dest.)

9.5.1.8 Sammelgelpuffer (pH 6,8)

- 0,5 M TRIS
- 7,88 g TRIS ad 100 ml A. dest.

9.5.1.9 Trenngelpuffer (pH 8,8)

- 1,5 M TRIS
- 23,64 g TRIS ad 100 ml A. dest.

9.5.1.10 Elektrodenpuffer (10x, pH 8,9, zum Gebrauch 1:10 mit A. dest. verdünnen)

- 1,44 g Glycin
- 30 g TRIS-Base
- 10g SDS
- Ad 1 l A. dest.
- alternativ: 40 ml 10x SDS-PAGE Rotiphorese ad 400 ml A. dest.

9.5.2 Sonstige Pufferlösungen

9.5.2.1 TRIS-NaCl-Puffer (pH 7,6)

- 30 mM TRIS
- 130 mM NaCl
- 2 M HCl zur Einstellung des pH-Wertes auf 7,6

9.5.2.2 PBS (10x, pH 7,2)

- 80g NaCl
- 20g KCl
- 14,4g Na₂HPO₄
- 24g KH₂PO₄
- 1l A. dest.

9.5.3 Spermatologische Untersuchung

9.5.3.1 Eosin-Färbelosung (Hoffmann 2003)

- - 2 g Eosin-B
- - 3 g Natriumzitat
- - ad 100 ml A. dest.

9.5.3.2 Hypoosmotische Lösung (150 mosmol)

(Jeyendran et al., 1984; Riesenbeck et al., 2001; Hoffmann, 2003)

- - 0,735 g Natriumzitat
- - 1,351 g Fruktose
- - ad 100 ml A. dest.

9.5.4 Uppsala-Verdünner zur Kryokonservierung von Hundesamen

(Linde-Forsberg, 2001)

Uppsala Equex-2 System

- Verdünner 1 (865 Osm, pH 6,7)
 - TRIS 3,025 g
 - Zitronensäure 1,7 g
 - Fruktose 1,25 g
 - Streptomycin 0,1 g
 - A. dest. ad 77 ml
 - Benzylpenicillin 0,06 g (in 0,3 ml A. dest.)
 - Glycerol 3 ml
 - Eigelb 20 ml
- Verdünner 2 (1495 mOsm, pH 6,7)
 - TRIS 3,025 g
 - Zitronensäure 1,7 g

- Fruktose 1,25 g
- Streptomycin 0,1 g
- A. dest. ad 72 ml
- Benzylpenicillin 0,06 g (in 0,3 ml A. dest.)
- Glycerol 7 ml
- Equex 1 ml
- Eigelb 20 ml
- Auftaumedium (324 mOsm, pH 6,8)
 - TRIS 3,025 g
 - Zitronensäure 1,7 g
 - Fruktose 1,25 g
 - Streptomycin 0,1 g
 - A. dest. ad 100 ml
 - Benzylpenicillin 0,06 g (in 0,3 ml A. dest.)

9.6 Herstellerangaben

Bauknecht Hausgeräte GmbH
Industriestr. 48
70565 Stuttgart
Tel.: +49 (0)711 /81071-0
Fax: +49 (0)711 /81071-3333
E-Mail: bauknecht.de@bauknecht.com
Webseite: www.bauknecht.de

HBG Henneberg-Sander GmbH
Fabrik für Laborglas
Schwimmbadweg 12
35398 Gießen-Lützellinden
Tel.: +49 (0)6403 /3294 + 8652
Fax: +49 (0)6403 /74990
E-Mail: HBG.Henneberg-Sander@t-online.de
Internet: <http://www.hbg-henneberg-sander.com>

Andreas *Hettich* GmbH & Co.KG
Föhrenstraße 12
78532 Tuttlingen

Sartorius AG
Weender Landstrasse 94-108
37075 Göttingen
Tel.: +49 (0)551 /3080
Fax: +49 (0)551 /308 3289
E-Mail: info@sartorius.com

megro GmbH + Co. KG
Medizinischer Großhandel

Am Schornacker 30
46485 Wesel
Tel.: +49 (0)281 /9899-0
E-Mail: info@megro.de

GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH
Schulze-Delitzsch-Straße 4,
30938 Burgwedel
Tel.: +49 (0)51 /39 99 58-0
Fax: +49 (0)51 /39 99 58-21
E-Mail: info@gfl.de

AppliChem GmbH
Ottoweg 4
64291 Darmstadt
Tel.: +49 (0)6151 /9357-0 (gebührenfrei in Deutschland 0800 277 5424)
Fax: +49 (0)6151 /9357-11 (gebührenfrei in Deutschland 0800 277 5422)
E-Mail: service@de.applichem.com

VWR International GmbH
Graumannsgasse 7
1150 Wien
Tel.: +43 (0)1 /97 002 0
Fax: +43 (0)1 /97 002 600
E-Mail: info@vwr.com

Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG
Beuckestraße 22
14163 Berlin
Telefon: +49 (0)30 /801 91-0
Telefax: +49 (0)30 /801 91-200
E-Mail: knick@knick.de
Internet: <http://www.knick.de>

Beckman Coulter GmbH
Europark Fichtenhain B 13
47807 Krefeld
Telefon: +49 (0)2151 /333-5
Telefax: +49 (0)2151 /333-633
E-Mail: info@beckmancoulter.de
Internet: <http://www.beckmancoulter.de>

IKA®-Werke GmbH & CO. KG
Janke & Kunkel-Str. 10
79219 Staufen
Tel.: +49 (0)7633 /831-0
Fax: +49 (0)7633 /831-98
E-Mail: info@ika.de

CARL ROTH GMBH + CO. KG
Schoemperlenstr. 1-5
76185 Karlsruhe
Tel.: +49 (0)721 /5606-0
Fax: +49 (0)721 /56 06-149
E-Mail: info@carlroth.de
Internet: www.carlroth.de

SCHOTT-GERÄTE GmbH
Hattenbergstraße 10
55122 Mainz
Tel.: +49 (0)6131 /66-91 17
Fax: +49 (0)6131 /66-90 01

GYNEMED GmbH & Co. KG
Lübecker Straße 9
23738 Lensahn
Tel.: +49 (0)4363 /90329-0
Fax: +49 (0)4363 /90329-19

MTX Lab Systems, Inc.
8456 Tyco Road, Building D
Vienna, Virginia 22182 U.S.A.

Mettler-Toledo (Schweiz) GmbH
Im Langacher 44
8606 Greifensee
Verkauf+41 44 /44 45 45
Service +41 61 /711 79 01

Bio-Rad Laboratories GmbH
Heidemannstraße 164
80939 München
Tel.: +49 (0)89 /31884-0
Fax: +49 (0)89 /31884-100
E-Mail: info@bio-rad.de

Greiner Bio-One GmbH
Maybachstrasse 2
72636 Frickenhausen
Tel.: +49 (0)7022 /948-0
Fax: +49 (0)7022 /948-514
E-Mail: info@de.gbo.com

Heidolph Instruments GmbH & Co.KG
Walpersdorfer Str. 12
91126 Schwabach

Tel.: +49 (0)9122 /9920-0
Fax: +49 (0)9122 /9920-65
E-Mail: sales@heidolph.de

Heraeus Holding GmbH

Heraeusstraße 12-14
63450 Hanau
Tel.: +49 (0)6181 /35-0
E-Mail: pr@heraeus.com

Kendro Laboratory Products GmbH

Heraeusstraße 12-14
63450 Hanau
Tel.: +49 (0)1805 /53 63 76
Fax: +49 (0)1805 /11 21 14
E-Mail: info@kendro.de
Internet: www.kendro.de

Albert Tröndle Großhandel

St.-Nikolaus-Straße 17
82272 Moorenweis
Tel.: +49 (0)8146 /94194
Fax: +49 (0)8146 /94196

Carl Zeiss Microscopy GmbH

Carl-Zeiss-Str. 56
73447 Oberkochen
Tel.: +49 (0)3641 /64-3949

Texas Instruments Incorporated

Executive Offices

12500 TI Boulevard
Dallas, Texas 75243 USA

Mailing Address

P.O. Box 660199
Dallas, TX 75266-0199
Tel.:+49 (0)972 /995-2011, Germany

BIOTREND Chemikalien GmbH

Technologiezentrum Köln
Eupener Str. 157
50933 Köln
Tel.: +49 (0)221 /9498320
Fax: +49 (0)221 /9498325
E-Mail: jaeger@biotrend.com
<http://www.biotrend.com/com/home>

Bender & Hobein GmbH Labortechnik Chemikalien
John-Deere-Str. 5
76646 [Bruchsal](#)
Tel.: +49 (0)7251 /7170

Merck KGaA
Frankfurter Straße 250
64293 Darmstadt
Tel.: +49 (0) 6151/720
www.merck.de

Fisher Scientific-Germany GmbH
Im Heiligen Feld 17
58239 Schwerte , Germany
Tel.:+49 (0)2304 /932-5
Fax: +49 (0)2304 /932-950
E-Mail: info.germany@thermofisher.com

VWR International-Germany GmbH
Hilpertstraße 20a
64295 Darmstadt
Tel.: +49 (0)6151 /39 72-0
Fax: +49 (0)6151 /39 72-450
info@de.vwr.com

HLC-Haep Labor Consult
Ritterstieg 1A
37120 Bovenden Eddigehausen
Tel.: +49 (0)5594 /9 31 50

biostep GmbH
Meinersdorfer Straße 47a
09387 Jahnsdorf
Tel.: +49 (0)3721 /3905-0
Fax: +49 (0)3721 /3905-28
E-Mail: info@biostep.de
Webseite: www.biostep.de

Hoefer, Inc.
84 October Hill Rd
Holliston, MA 01746
Toll Free: 1-800-227-4750
Tel.: 1-508-893-8999
Fax: 1-508-429-5732
Customer Service: sales@hoeferinc.com
Tech Support (N. America): support@hoeferinc.com
Tech Support (International): intlsupport@hoeferinc.com Webseite:
<http://www.hoeferinc.com>

B. Braun Melsungen AG
Carl-Braun-Str. 1
34209 Melsungen
Tel.: +49 (0)5661 /71-0
Fax: +49 (0)5661 /71-4567
Webseite: www.bbraun.de

Eppendorf AG
Barkhausenweg 1
22331 Hamburg
Tel.: +49 (0)40 /53801-0
Fax: +49 (0)40 /53801-556
E-Mail: eppendorf@eppendorf.de
Webseite: www.eppendorf.de

Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG
Stettener Str. 22-24
97647 Sondheim
Tel.: +49 (0)9779 /808-0
Fax: +49 (0)9779 /808-88
E-Mail: info@hecht-assistent.de
Webseite: www.hecht-assistent.de

Heidolph Instruments GmbH & Co.KG
Walpersdorfer Str. 12
91126 Schwabach
Tel.: +49 (0)9122 /9920-0
Fax: +49 (0)9122 /9920-65
E-Mail: sales@heidolph.de
Webseite: www.heidolphinstruments.de

Heraeus Holding GmbH
Heraeusstr. 12-14
Postfach 1561
63450 Hanau
Tel.: +49 (0)6181 /35-0
Fax: +49 (0)6181 /35-35 50
E-Mail: pr@heraeus.com
Webseite: www.heraeus.de

Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH
Rudorffweg 10
21031 Hamburg
Tel.: +49 (0)40 /739204-0
Fax: +49 (0)40 /7304148
E-Mail: hvh@herenz.de
Webseite: www.herenz.de

Helmut Hund GmbH
Wilhelm-Will-Str. 7
35580 Wetzlar
Tel.: +49 (0)6441 /2004-0
Fax: +49 (0)6441 /2004-44
E-Mail: info@hund.de
Webseite: www.hund.de

Interessengemeinschaft der Laborfachhändler GmbH & Co KG
Robert-Bosch-Str. 3
61130 Nidderau

Leica Microsystems GmbH
Ernst-Leitz-Str. 17-37
35578 Wetzlar
Tel.: +49 (0)6441 /29-0
Fax: +49 (0)64 41 /29-2590
Webseite: www.leicamicrosystems.com

Leja Products B. V.
Luzernestraat 10
Tel.: +31 (0)252 /621848
Fax: +31 (0)252 /621806
2153 GN Nieuw-Vennep, Niederlande
Webseite: www.leja.nl

MAGV GmbH
Laborbedarf und Laborgeräte
Giessener Str. 48
35466 Rabenau
Tel.: +49 (0)6407 /90388
E-Mail: Kontakt@MAGV-GmbH.de
Webseite: www.magv-gmbh.de

Memmert GmbH & Co. KG
Ausere Rittersbacher Str. 38
91126 Schwabach
Tel.: +49 (0)9122 /925-0
Fax: +49 (0)9122 /14585
E-Mail: sales@memmert.com
Webseite: www.memmert.com

Statistical Solutions Ltd
4500 Airport Business Park
Cork, Ireland
Tel: + 353 21 /4839100
Fax: + 353 21 /4840026

Gerhard Menzel
Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG
Saarbrückener Str. 248
38116 Braunschweig
Tel.: +49 (0)531 /59008
Fax: +49 (0)531 /5097990
Webseite: www.menzel.de

Merck KGaA
Frankfurter Str. 250
64293 Darmstadt
Tel.: +49 (0)6151 /72-0
Fax: +49 (0)6151 /72-2000
E-Mail: service@merck.de
Webseite: www.merck.de

Mettler-Toledo GmbH
Ockerweg 3
Postfach 110840
35353 Giessen
Tel.: +49 (0)641 /5070
Fax: +49 (0)641 /52951
Webseite: de.mt.com

Miele & Cie. KG
Carl-Miele-Str. 29
33332 Gütersloh
Tel.: +49 (0)5241 /89-0
Fax: +49 (0)5241 /89-2090
E-Mail: info@miele.de
Postfach 33325 Gütersloh
Webseite: www.miele.de

Minitüb GmbH
Hauptstr. 41
84184 Tiefenbach
Tel.: +49 (0)8709 /9229-0
Fax: +49 (0)8709 /9229-39
E-Mail: minitube@minitube.de
Webseite: www.minitube.de

Olympus Deutschland GmbH
Wendenstr. 14–18
20097 Hamburg
Tel.: +49 (0)40 /23773-0
Fax: +49 (0)40 /230817
E-Mail: info@olympus.de
mikroskopie@olympus.de
Webseite: www.olympus.de

Pechiney Plastic Packaging
289 River St Menasha
WI 54952, USA
Tel.: 920-727-6188
Webseite: www.pechineyplasticpackaging.com

Rainin Instrument LLC Ordering: 800-472-4646
7500 Edgewater Drive
P.O. Box 2160
Oakland, CA 94621-3027, USA
Tel: 510-564-1600
Fax: 510-564-1727
Webseite: www.rainin.com

Carl Roth GmbH & Co. KG
Schoemperlenstr. 1-5
76185 Karlsruhe
Postfach 100121
76231 Karlsruhe
Tel.: +49 (0)721 /5606-0
Fax: +49 (0)721 /5606-149
E-Mail: info@carlroth.de
Webseite: www.carlroth.de

Sarstedt AG & Co.
Sarstedtstrasse
Postfach 1220
51582 Numbrecht
Tel.: +49 (0)2293 /305-0
Fax: +49 (0)2293 /305-282
E-Mail: info@sarstedt.com
Webseite: www.sarstedt.com

Schott North America, Inc., Corporate Office
555 Taxter Road
Elmsford, NY 10523, USA
Tel.: +1 (914) 831-2200
Fax: +1 (914) 831-2201
Webseite: www.us.schott.com

Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH
Wunstorferstr. 40
30926 Seelze
Tel.: +49 (0)5137 /8238-0
Fax: +49 (0)5137 /8238-120
E-Mail: riedel@sial.com
Webseite: www.sigmaaldrich.com

Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Riedstr. 2
89555 Steinheim
Tel.: +49 (0)7329 /97-0
Fax: +49 (0)7329 /97-2160
E-Mail: Deorders@sial.com
Webseite: www.sigmaaldrich.com

9.7 Ergebnistabellen

Tab. 41: Rassen-, Alters- und Gewichtsangaben zu den Probanden sowie Verteilung der Untersuchungen (n=35, Altersverteilung: 4,23±2,25 Jahre, Gewichtsverteilung: 32,2±16,1 kg)

Nr.	Alter ¹	Gewicht ²	Rasse	Sperma- befund	LM ³	EM ⁴	PL ⁵	Ch ⁶	SDS ⁷	MALDI ⁸	TG ⁹
1	3	10,8	Beagle	a	obB	X	X	X	X	X	X
2	3,5	8,5	Beagle	a	obB	X	X	X	X	X	
3	2	18	Münsterländer	a	obB		X	X	X		
4	2	25	Mischling	a	obB				X		
5	4,5	27,6	Bearded Collie	a	obB	X	X	X	X		
6	5	17	Bearded Collie	a	obB	X	X	X	X		
7	7	32	Golden Retriever	a	obB	X			X		
8	4	30	Golden Retriever	a	obB		X	X	X	X	
9	1,5	33	Rottweiler	a	obB	X	X		X		X
10	2,5	40	Deutscher Schäferhund	a	obB		X	X	X		
11	1,25	80	Deutsche Dogge	a	obB	X	X	X	X	X	
12	4,5	15	Bull Terrier	a	obB	X			X		
13	7,5	25	Gordon Setter	a	obB	X			X	X	
14	5,5	25	Gordon Setter	a	obB	X			X	X	
15	2	80	Bernhardiner	a	obB	X	X	X			
16	4,5	40	Rottweiler	a	obB	X	X	X			
17	3,5	31	Collie	b	obB	X		X			
18	3	36	Otterhund	a	obB		X	X			
19	4,5	38	Old English Sheepdog	a	obB		X				
20	8,5	53	Amerikanische Bulldogge	a	obB		X				
21	3	30	Golden Retriever	a	obB						X
22	5	26	Labrador Retriever	a	obB						
23	1,5	25	Nova Scotia Duck Tolling Retriever	a	obB						
24	5	25	Nova Scotia Duck Tolling Retriever	a	obB						
25	5	35	Labrador Retriever	a	obB						X
26	5	35	Labrador Retriever	a	obB						X
27	1,5	35	Golden Retriever	a	obB						X
28	4	18	Welsh-Corgi Pembroke	a	obB	X					X
29	5,5	28	Bearded Collie	a	obB	X					X
30	7,5	30	Golden Retriever	a	obB	X					X
31	1,3	35	Schwarzer Schäferhund	a	obB						X
32	11	35	Deutscher Schäferhund	b	obB	X					
33	6	35	Weißer Schäferhund	c	wenige Vesikel						

Anhang

34	2	60	Leonberger	a	obB						
35	5	9,4	Beagle (kastriert)	d	nur sehr kleine Vesikel	X					

¹ Alter gerundet in Jahren; ² Gewicht in kg; ³ Lichtmikroskopischer Befund bezüglich Vesikelgehalt („ohne besonderen Befund“ (obB) entspricht Bild bei Normospermie); ⁴ Elektronenmikroskopie; ⁵ Messung der Phospholipide Sphingomyelin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin; ⁶ Messung von Cholesterol; ⁷ Elektrophoretische Auftrennung der Probe mittels SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis); ⁸ Analyse mittels MALDI-TOF-MS (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization- Time-Of-Flight Mass Spectrometer); ⁹ Teilnahme an Tiefgefriersversuch 1 und 2; a= Normospermie; b= Hypokinozoospermie; c= Zytoplasmotropfenhaltige Spermien; d= Azoospermie (Kastrat)

Tab. 42: Rasseverteilung der Probanden

Rasse	Anzahl Probanden
Welsh-Corgi Pembroke	1
Beagle	3
Bull Terrier	1
Otterhund	1
Bearded Collie	3
Münsterländer	1
Collie	1
Old English Sheepdog	1
Amerikanische Bulldogge	1
Gordon Setter	2
Nova Scotia Duck Tolling Retriever	2
Golden Retriever	5
Labrador Retriever	3
Deutscher Schäferhund	2
Schwarzer Schäferhund	1
Weißer Schäferhund	1
Rottweiler	2
Deutsche Dogge	1
Leonberger	1
Bernhardiner	1
Mix	1

Tab. 43: Häufigkeitsverteilung der einzelnen Vesikeltypen bei Normospermie, Hypokinozoospermie und Azoospermie, absolute Werte

absolut	Typ A	Typ B	Typ C1	Typ C2	Typ F	Typ G	Typ H	Typ i	Typ K1	Typ K2	Typ L	Summe
Rüde 1	19	40	21	7	28	72	14	27	4	2	1	235
Rüde 2	22	10	32	16	38	46	15	32	5	5	1	222
Rüde 12	13	15	8	15	34	46	13	20	2	1	1	168
Rüde 16	9	26	15	18	38	49	17	19	3	2	1	197
Rüde 6	19	28	18	13	32	61	10	30	4	0	0	215
Rüde 5	10	10	11	19	26	48	16	27	6	0	0	173
Rüde 9	10	22	23	22	34	52	15	16	5	2	1	202
Rüde 11	19	28	14	13	40	43	17	13	9	10	0	206
Rüde 15	20	38	24	11	32	94	17	42	7	0	2	287
Rüde 14	20	36	17	16	101	96	19	20	2	1	0	328
Rüde 13	15	35	26	20	46	49	16	17	2	2	1	229
Rüde 28	19	15	21	10	46	50	8	13	3	21	1	207
Rüde 29	20	15	15	19	27	28	14	33	12	9	2	194
Rüde 30	30	20	21	19	17	44	14	14	13	2	2	196
Rüde 7	35	12	13	12	30	42	7	30	5	2	2	190
Normo-spermie (n=15)	280	350	279	230	569	820	212	353	82	59	15	3249
Rüde 17	9	25	36	15	34	52	28	18	6	1	1	225
Rüde 32	21	18	19	12	32	50	19	13	8	2	6	200
Hypokinozoospermie (n=2)	30	43	55	27	66	102	47	31	14	3	7	425
Azoospermie (n=1); Rüde 35	8	13	33	20	25	48	20	29	11	2	4	213

n= Anzahl der Probanden

Tab. 44: Häufigkeitsverteilung der einzelnen Vesikeltypen bei Normospermie, Hypokinozoospermie und Azoospermie, relative Werte

relativ	Typ A	Typ B	Typ C1	Typ C2	Typ F	Typ G	Typ H	Typ i	Typ K1	Typ K2	Typ L	Summe
Rüde 1	8,09	17,02	8,94	2,98	11,91	30,64	5,96	11,49	1,70	0,85	0,43	100,00
Rüde 2	9,91	4,50	14,41	7,21	17,12	20,72	6,76	14,41	2,25	2,25	0,45	100,00
Rüde 12	7,74	8,93	4,76	8,93	20,24	27,38	7,74	11,90	1,19	0,60	0,60	100,00
Rüde 16	4,57	13,20	7,61	9,14	19,29	24,87	8,63	9,64	1,52	1,02	0,51	100,00
Rüde 6	8,84	13,02	8,37	6,05	14,88	28,37	4,65	13,95	1,86	0,00	0,00	100,00
Rüde 5	5,78	5,78	6,36	10,98	15,03	27,75	9,25	15,61	3,47	0,00	0,00	100,00
Rüde 9	4,95	10,89	11,39	10,89	16,83	25,74	7,43	7,92	2,48	0,99	0,50	100,00
Rüde 11	9,22	13,59	6,80	6,31	19,42	20,87	8,25	6,31	4,37	4,85	0,00	100,00
Rüde 15	6,97	13,24	8,36	3,83	11,15	32,75	5,92	14,63	2,44	0,00	0,70	100,00
Rüde 14	6,10	10,98	5,18	4,88	30,79	29,27	5,79	6,10	0,61	0,30	0,00	100,00
Rüde 13	6,55	15,28	11,35	8,73	20,09	21,40	6,99	7,42	0,87	0,87	0,44	100,00
Rüde 28	9,18	7,25	10,14	4,83	22,22	24,15	3,86	6,28	1,45	10,14	0,48	100,00
Rüde 29	10,31	7,73	7,73	9,79	13,92	14,43	7,22	17,01	6,19	4,64	1,03	100,00
Rüde 30	15,31	10,20	10,71	9,69	8,67	22,45	7,14	7,14	6,63	1,02	1,02	100,00
Rüde 7	18,42	6,32	6,84	6,32	15,79	22,11	3,68	15,79	2,63	1,05	1,05	100,00
Normospermie (n=15)	8,62	10,77	8,59	7,08	17,51	25,24	6,53	10,86	2,52	1,82	0,46	100,00
Mittelwert (arithmetisch)	8,78	10,54	8,60	7,35	17,18	24,88	6,61	11,03	2,64	1,90	0,48	100,00
SD	3,63	3,59	2,53	2,49	5,15	4,55	1,59	3,85	1,75	2,64	0,36	0,00
Minimum	4,57	4,50	4,76	2,98	8,67	14,43	3,68	6,10	0,61	0,00	0,00	100,00
Maximum	18,42	17,02	14,41	10,98	30,79	32,75	9,25	17,01	6,63	10,14	1,05	100,00
Rüde 17	4,00	11,11	16,00	6,67	15,11	23,11	12,44	8,00	2,67	0,44	0,44	100,00
Rüde 32	10,50	9,00	9,50	6,00	16,00	25,00	9,50	6,50	4,00	1,00	3,00	100,00
Hypokinozoospermie (n=2)	7,06	10,12	12,94	6,35	15,53	24,00	11,06	7,29	3,29	0,71	1,65	100,00
Azoospermie (n=1); Rüde 35	3,76	6,10	15,49	9,39	11,74	22,54	9,39	13,62	5,16	0,94	1,88	100,00

n= Anzahl der Probanden

Tab. 45: Ergebnisse der Lipidanalyse (Phospholipide)

Rüde	SM (µg/µg Protein)	SM (µg/µl Probe)	PC (µg/µg Protein)	PC (µg/µl Probe)	PE (µg/µg Protein)	PE (µg/µl Probe)
Rüde 5	0,19582656	0,05091491	0,15920078	0,0413922	0,46634896	0,12125073
Rüde 6	0,08843407	0,02122418	0,09843059	0,02362334	0,4989158	0,11973979
Rüde 9	0,10870663	0,16305994	0,0622515	0,09337725	0,22114986	0,3317248
Rüde 15	0,05908382	0,02245185	0,07008018	0,02663047	fehlt	fehlt
Rüde 1	0,06410814	0,14103791	0,06357111	0,13985644	0,1221568	0,26874496
Rüde 10	0,06903623	0,13807245	0,06682149	0,13364299	0,13763581	0,27527162
Rüde 3	0,06561859	0,32809296	0,0630452	0,31522601	0,13130111	0,65650555
Rüde 8	0,09152578	0,20593301	0,08339061	0,18762887	0,16124698	0,3628057
Rüde 16	0,10358696	0,08597718	0,08449586	0,07013156	0,19751136	0,16393443
Rüde 11	0,056899	0,21052632	0,03034557	0,11227861	0,06046762	0,22373018
Rüde 2	0,08900413	0,17800826	0,06837607	0,13675214	0,30131965	0,6026393
Rüde 19	0,04227733	0,11753099	0,01310855	0,03644177	0,10854659	0,30175953
Rüde 20	0,02053804	0,00451837	0,00916991	0,00201738	0,27844427	0,06125774
Rüde 18	0,15126218	0,2079855	0,03458739	0,04755766	0,30107527	0,41397849
n	14	14	14	14	13	13
\bar{x}	0,08613625	0,13395242	0,06477677	0,09761119	0,22970154	0,30025714
SD	0,04484319	0,09132835	0,03792555	0,08326086	0,13537484	0,17888388
VK	0,52060768	0,68179697	0,5854807	0,85298476	0,58935101	0,59576895
\bar{x}_{geom}	0,07572056	0,08865343	0,05219185	0,06110609	0,19526115	0,24928134
SF	1,73401864	3,28024047	2,17197171	3,47554119	1,83355405	1,96347843
Minimum	0,02053804	0,00451837	0,00916991	0,00201738	0,06046762	0,06125774
Maximum	0,19582656	0,32809296	0,15920078	0,31522601	0,4989158	0,65650555

n= Anzahl der Probanden, \bar{x} = arithmetischer Mittelwert; SD= Standardabweichung; VK= Varianzkoeffizient; \bar{x}_{geom} = geometrischer Mittelwert; SF: Streufaktor; SM= Sphingomyelin; PC= Phosphatidylcholin; PE= Phosphatidylethanolamin

Tab. 46: Ergebnisse der Lipidanalyse (Cholesterol)

Rüde	µg Cholesterol /µg Protein
Rüde 1	0,24362319
Rüde 3	0,1421859
Rüde 15	0,07613333
Rüde 6	0,14944039
Rüde 8	0,0377907
Rüde 10	0,10946667
Rüde 11	0,00875
Rüde 2	0,20593525
Rüde 5	0,01391941
Rüde 16	0,08325751
Rüde 17	0,01028257
Rüde 18	0,18690476
n	12
\bar{x}	0,10564081
SD	0,08081387
VK	0,76498728
\bar{x}_{geom}	0,06576314
SF	3,3331665
Maximum	0,24362319
Minimum	0,00875

n= Anzahl der Probanden, \bar{x} = arithmetischer Mittelwert; SD= Standardabweichung; VK= Varianzkoeffizient; \bar{x}_{geom} = geometrischer Mittelwert; SF: Streufaktor

9.8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Protokoll zur Aufreinigung der reinen Vesikelproben aus dem caninen Ejakulat	64
Abb. 2: Beispiel eines Elutionsdiagramms von Rüde 11.	65
Abb. 3: Auftrennung der spermienreichen Fraktion nach der Dichtegradientenzentrifugation mit SpermFilter® (SpermFilter®, Gynemed GmbH & Co.KG, Lensahn).....	87
Abb. 4: Lichtmikroskopische Aufnahme (200-fache Vergrößerung) der spermienreichen Fraktion (Fraktion 2) von Rüde 1.	95
Abb. 5: Lichtmikroskopische Aufnahme (400-fache Vergrößerung) der spermienreichen Fraktion (Fraktion 2) von Rüde 1, die die unterschiedliche Morphologie der Vesikel deutlich darstellt.....	96
Abb. 6: Lichtmikroskopische Aufnahme (200-fache Vergrößerung) der dritten Fraktion von Rüde 1.	97
Abb. 7: Dargestellt ist ein Vesikel, das von mehreren Membranen umschlossen ist	98
Abb. 8: Elektronenmikroskopische Darstellung der Vesikeltypen	102
Abb. 9: Vesikel mit nasenartiger Ausziehung der Vesikelmembran	102
Abb. 10: Häufigkeiten der Vesikeltypen im Ejakulat bei Rüden mit Normospermie (n=15).....	106
Abb. 11: Häufigkeiten der Vesikeltypen im Ejakulat bei Rüden mit Hypokinozoospermie (n=2).....	107
Abb. 12: Häufigkeiten der Vesikeltypen im Ejakulat bei Rüden mit Azoospermie (Kastrat, n=1).....	107
Abb. 13: Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Vesikelproben mittels HPTLC.	109
Abb. 14: Die dünnschichtchromatographische Auftrennung einiger Proben zeigte ein komplexes Lipidmuster.....	110
Abb. 15: Elektrophoretische Auftrennung von Vesikelprobe (1) und Spermienprobe (2) mit nachfolgender Coomassiefärbung	112
Abb. 16: Proteinmuster der Vesikel nach elektrophoretischer Auftrennung (SDS-PAGE) und Silberfärbung.	113
Abb. 17: Proteinmuster der Spermienproben nach elektrophoretischer Auftrennung (SDS-PAGE)..	113
Abb. 18: Veränderung des prozentualen Anteils der Gesamtmotilität in den Spermienproben in Abhängigkeit der drei verschiedenen Behandlungen über die Zeit.....	117
Abb. 19: Veränderung der prozentualen Vorwärtsbeweglichkeit (CASA-Parameter) in den Spermienproben in Abhängigkeit der drei verschiedenen Behandlungen über die Zeit.....	118
Abb. 20: Veränderung des Motilitätsparameters DAP in den Spermienproben in Abhängigkeit der drei verschiedenen Behandlungen über die Zeit.....	119
Abb. 21: Veränderung des Motilitätsparameters VSL in den Spermienproben in Abhängigkeit der drei verschiedenen Behandlungen über die Zeit.....	124
Abb. 22: Veränderung des Anteils der lebenden Spermien in den Spermienproben in Abhängigkeit der drei verschiedenen Behandlungen über die Zeit.	130
Abb. 23: Veränderung des prozentualen Anteils der subjektiv geschätzten Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien in Abhängigkeit der drei verschiedenen Behandlungen über die Zeit.	135
Abb. 24: Veränderung des prozentualen Anteils der computer-geschätzten Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien in Abhängigkeit der drei verschiedenen Behandlungen über die Zeit.	137

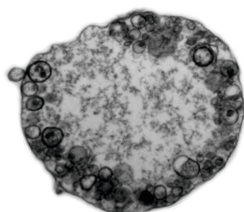
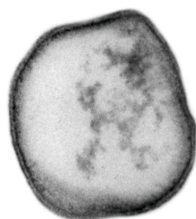
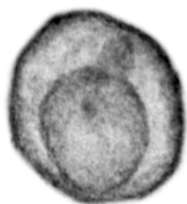
9.9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Lipidom der humanen Vesikel im Vergleich zu humanen Spermienzellen	26
Tab. 2: Lipidom der Vesikel im Ejakulat des Rammlers	42
Tab. 3: Vorbereitung der Standardreihe zur Schätzung der Proteinkonzentration mittels BCA-Kit aus „Instructions“ des Pierce™ BCA Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA)	66
Tab. 4: Densitometrisch gemessene Werte aus dem Versuch zum Einfluss des Resuspensionsvolumens auf die Reproduzierbarkeit der Messungen	79
Tab. 5: Verteilung der Proben auf der HPTLC-Platte	80
Tab. 6: Vesikeltypen und Einteilungskriterien	99
Tab. 7: Ergebnisse der Messung der Vesikeldurchmesser bei Normospermie (n= 15) in nm	104
Tab. 8: Ergebnisse der Messung der Vesikeldurchmesser bei Hypokinozoospermie (n= 2) in nm	104
Tab. 9: Ergebnisse der Messung der Vesikeldurchmesser bei Azoospermie (n= 1) in nm	104
Tab. 10: R _F -Werte zur Auswertung der dünnschichtchromatographischen Auftrennung bezüglich Abb. 13	109
Tab. 11: Übersicht der Ergebnisse der MALDI-TOF-Analyse	114
Tab. 12: Ergebnisse der subjektiv geschätzten, prozentualen Vorwärtsbeweglichkeit ($\bar{x}_{\text{mod}} \pm 1\text{-s}$ -Bereich, Min., Max.) der Spermien in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit	116
Tab. 13: Ergebnisse der Messung des CASA-Streckenparameters DCL ($\bar{x} \pm \text{SD}$, Min., Max.) der Spermien in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit	120
Tab. 14: Ergebnisse der Messung des CASA-Streckenparameters DSL ($\bar{x} \pm \text{SD}$, Min., Max.) der Spermien in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit	121
Tab. 15: Ergebnisse der Messung des CASA-Geschwindigkeitsparameters VAP ($\bar{x} \pm \text{SD}$, Min., Max.) der Spermien in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit	122
Tab. 16: Ergebnisse der Messung des CASA-Geschwindigkeitsparameters VCL ($\bar{x} \pm \text{SD}$, Min., Max.) der Spermien in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit	123
Tab. 17: Ergebnisse der Messung des CASA-Parameters STR ($\bar{x} \pm \text{SD}$, Min., Max.) der Spermien in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit	125
Tab. 18: Ergebnisse der Messung des CASA-Parameters LIN ($\bar{x} \pm \text{SD}$, Min., Max.) der Spermien in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit	126
Tab. 19: Ergebnisse der Messung des CASA-Parameters WOB ($\bar{x} \pm \text{SD}$, Min., Max.) der Spermien in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit	127
Tab. 20: Ergebnisse der Messung des CASA-Parameters ALH ($\bar{x} \pm \text{SD}$, Min., Max.) der Spermien in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit	127
Tab. 21: Ergebnisse der Messung des CASA-Parameters BCF ($\bar{x} \pm \text{SD}$, Min., Max.) der Spermien in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit	128
Tab. 22: Ergebnisse der Messung des prozentualen Anteils membranintakter Spermien ($\bar{x} \pm \text{SD}$, Min., Max.) mittels HOS-Test in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit	129
Tab. 23: Prozentualer Anteil morphologisch unauffälliger Spermien ($\bar{x} \pm \text{SD}$, Min., Max.) im Spermac®-Ausstrich in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit	130
Tab. 24: Prozentualer Anteil an losen Spermienköpfen ($\bar{x} \pm \text{SD}$, Min., Max.) im Spermac®-Ausstrich in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit	131
Tab. 25: Prozentualer Anteil an Akrosomdefekten der Spermien ($\bar{x} \pm \text{SD}$, Min., Max.) im Spermac®-Ausstrich in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit	132

Tab. 26: Prozentualer Anteil an Kopfdefekten der Spermien ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) im Spermac®-Ausstrich in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit	132
Tab. 27: Prozentualer Anteil an Geißeldefekten der Spermien ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) im Spermac®-Ausstrich in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit	133
Tab. 28: Prozentualer Anteil an Spermien mit Zytoplasmatropfen ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) im Spermac®-Ausstrich in Abhängigkeit von Vesikelzugabe bzw. Zugabezeitpunkt über die Zeit	133
Tab. 29: Prozentuale Gesamtmotilität der Spermien ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) in Abhängigkeit von zugegebener Vesikelkonzentration über die Zeit	136
Tab. 30: Ergebnisse der Messung des CASA-Streckenparameters DAP ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) in Abhängigkeit von der zugegebenen Vesikelkonzentration über die Zeit	137
Tab. 31: Ergebnisse der Messung des CASA-Streckenparameters DCL ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) in Abhängigkeit von der zugegebenen Vesikelkonzentration über die Zeit	138
Tab. 32: Ergebnisse der Messung des CASA-Streckenparameters DSL ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) in Abhängigkeit von der zugegebenen Vesikelkonzentration über die Zeit	138
Tab. 33: Ergebnisse der Messung des CASA-Geschwindigkeitsparameters VAP ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) in Abhängigkeit von der zugegebenen Vesikelkonzentration über die Zeit	140
Tab. 34: Ergebnisse der Messung des CASA-Geschwindigkeitsparameters VCL ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) in Abhängigkeit von der zugegebenen Vesikelkonzentration über die Zeit	140
Tab. 35: Ergebnisse der Messung des CASA-Geschwindigkeitsparameters VSL ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) in Abhängigkeit von der zugegebenen Vesikelkonzentration über die Zeit	141
Tab. 36: Ergebnisse der Messung des CASA-Parameters STR ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) in Abhängigkeit von der zugegebenen Vesikelkonzentration über die Zeit	141
Tab. 37: Ergebnisse der Messung des CASA-Parameters LIN ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) in Abhängigkeit von der zugegebenen Vesikelkonzentration über die Zeit	142
Tab. 38: Ergebnisse der Messung des CASA-Parameters WOB ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) in Abhängigkeit von der zugegebenen Vesikelkonzentration über die Zeit	143
Tab. 39: Ergebnisse der Messung des CASA-Streckenparameters ALH ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) in Abhängigkeit von der zugegebenen Vesikelkonzentration über die Zeit	143
Tab. 40: Ergebnisse der Messung des CASA-Streckenparameters BCF ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.) in Abhängigkeit von der zugegebenen Vesikelkonzentration über die Zeit	144
Tab. 41: Rassen-, Alters- und Gewichtsangaben zu den Probanden sowie Verteilung der Untersuchungen (n=35, Altersverteilung: $4,23 \pm 2,25$ Jahre, Gewichtsverteilung: $32,2 \pm 16,1$ kg)	238
Tab. 42: Rasseverteilung der Probanden	239
Tab. 43: Häufigkeitsverteilung der einzelnen Vesikeltypen bei Normospermie, Hypokinozoospermie und Azoospermie, absolute Werte	240
Tab. 44: Häufigkeitsverteilung der einzelnen Vesikeltypen bei Normospermie, Hypokinozoospermie und Azoospermie, relative Werte	241
Tab. 45: Ergebnisse der Lipidanalyse (Phospholipide)	242
Tab. 46: Ergebnisse der Lipidanalyse (Cholesterol).....	243

10 Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. A. Wehrend für die Überlassung des interessanten Themas und für das entgegengebrachte Vertrauen bedanken. Ganz besonders bedanke ich mich auch bei Frau Prof. Dr. S. Goericke-Pesch für die gute Betreuung meiner Forschungsarbeit, für ihr immer offenes Ohr bei allen Fragen und Problemen sowie für die vielen motivierenden Worte und ihre konstruktive Kritik, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit sehr geholfen haben. Auch allen Mitarbeitern der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der JLU Gießen, die mir immer wieder hilfreich zur Seite standen, möchte ich danken. Mein ganz herzlicher Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Scheiner-Bobis für seine kompetente Unterstützung während aller Phasen der Dissertation und natürlich für die herzliche Aufnahme in seinem Team. Vielen Dank an dieser Stelle auch an Ulrike, Raimund, Mazen und Alexander für die vielen lehrreichen und geduldigen Erklärungen, die aufbauenden Gespräche und für die tolle, gemeinsame Zeit! Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch für die gute Zusammenarbeit mit dem Team um Herrn Prof. Dr. Bergmann des Instituts für Veterinär-Anatomie, -Histologie und Embryologie der JLU Gießen und für die gute Kooperation mit dem Team um Herrn Prof. Dr. Lochnit des Instituts für Biochemie, Fachbereich Medizin, der JLU Gießen, die mich beide im Vorankommen meiner Forschungsarbeit maßgeblich und kompetent unterstützt haben. Herrn Dr. K. Failing, Herrn Schaubmar und Frau M. Sparenberg von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der JLU Gießen danke ich für ihre Mithilfe bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse und für die geduldige Betreuung bei allen statistischen Fragen. Außerdem möchte ich mich bei allen Rüdenbesitzern für die Bereitstellung ihrer Hunde, ohne die diese Studie nicht möglich gewesen wäre, ganz herzlich bedanken. Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit danke ich der Gesellschaft zur Förderung Kynologischer Forschung und der Akademie für Tiergesundheit. Ich bedanke mich außerdem von ganzem Herzen bei meiner Freundin Kerstin für ihre Unterstützung während der gesamten Zeit, die vielen aufbauenden und ehrlichen Worte, ihr Verständnis und ihre unglaubliche Geduld. Mein Dank gilt auch Margit und Stefan, die mich durch ihre Arbeit immer wieder zur Fortführung meines Projekts motiviert haben. Zuletzt danke ich meinen Eltern von ganzem Herzen dafür, dass sie immer an mich glauben und mich bei allen Vorhaben unterstützen und mir damit meinen Lebensweg ermöglichen.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6358-0



9 783835 196358 0